

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

**Л. К. ШАТАЕВА, В. Х. ХАВИНСОН,
И. Ю. РЯДНОВА**

**ПЕПТИДНАЯ
САМОРЕГУЛЯЦИЯ
ЖИВЫХ СИСТЕМ
(ФАКТЫ И ГИПОТЕЗЫ)**



**САНКТ-ПЕТЕРБУРГ
«НАУКА»**

**L. K. SHATAEVA, V. Kh. KHAVINSON,
I. Yu. RYADNOVA**

**PEPTIDE
SELF-REGULATION
OF LIVING SYSTEMS
(FACTS AND HYPOTHESES)**



**St. PETERSBURG
«NAUKA»
2003**

**Л. К. ШАТАЕВА, В. Х. ХАВИНСОН,
И. Ю. РЯДНОВА**

**ПЕПТИДНАЯ
САМОРЕГУЛЯЦИЯ
ЖИВЫХ СИСТЕМ
(ФАКТЫ И ГИПОТЕЗЫ)**



**САНКТ-ПЕТЕРБУРГ
«НАУКА»
2003**

Шатаева Л. К., Хавинсон В. Х., Ряднова И. Ю. Пептидная саморегуляция живых систем (факты и гипотезы). — СПб.: Наука, 2003. 222 с.

ISBN 5-02-026192-0

Монография посвящена актуальной проблеме взаимосвязи структур и регуляторных (информационных) функций эндогенных пептидов и их синтетических аналогов, обеспечивающих саморегуляцию организма в условиях внешней или внутренней дестабилизации. В компактной форме представлены литературные данные о физико-химических свойствах аминокислот и пептидов, которые определяют их участие в межмолекулярных взаимодействиях и могут быть основой биологически значимых связей между ними. Предложена гипотеза о передаче биохимических сигналов в клетке и в межклеточной среде по системе водородных связей водного окружения пептидов и фосфолипидных мембран. В работе освещены некоторые молекулярные механизмы развития возрастной патологии. Представленные данные положены в основу практических подходов к получению лечебных препаратов функционально- и тканеспецифического действия как в форме природных комплексных пептидных препаратов, так и в виде их синтетических аналогов.

Монография предназначена для специалистов в области теоретической биологии, биофизики и клинической биохимии, а также для студентов и аспирантов, интересующихся вопросами молекулярной информатики. Библиогр. 376 назв. Ил. 14. Табл. 11.

Рецензенты:

д-р биол. наук проф. *В.Н. Кокряков* и

д-р биол. наук проф. *А.Т. Марьянович*

Shataeva L. K., Khavinson V. Kh., Ryadnova I. Yu. Peptide self-regulation of living systems (facts and hypotheses). — St. Petersburg: Nauka, 2003. 222 p.

The monograph is dedicated to the discussion problem of correlation between the structures and regulatory (informational) properties of endogenous peptides and their synthetic analogs, which secure the self-regulation of the organism under the conditions of external or internal destabilization. It presents a compact review of published data on the physical-chemical properties of amino acids and peptides, which determine their intermolecular interactions and can serve as the basis for biologically relevant links between them. It is proposed that biochemical signals within a cell and in an intercellular medium can be transmitted through the system of hydrogen bonds of water environment of the peptides and phospholipid membranes. Some molecular mechanisms of age-related pathology development are discussed. The presented data underlie the practical approaches to the production of function- and tissue-specific pharmaceuticals both in the form of natural peptide complexes and as their synthetic analogs.

The monograph is proposed for specialists in the theoretic biology, biophysics and clinical biochemistry, as well as for high school and postgraduate students interested in the problems of molecular informatics. Bibliography 376 references. Illustration 14 pict., 11 tabl.

© Издательство «Наука», 2003

© Л. К. Шатаева, В. Х. Хавинсон,
И. Ю. Ряднова, 2003

ISBN 5-02-026192-0

ПРЕДИСЛОВИЕ

Предлагаемая монография содержит систематизированные фактические данные о регуляторных пептидах и сформированные на этой базе гипотезы о механизмах их взаимодействия на уровне живой клетки и организма. Авторы преследуют главную цель — проследить, каким образом индивидуальные структурные и физико-химические характеристики пептидов определяют их взаимодействия друг с другом и с различными компонентами живой клетки и как эти взаимодействия складываются в координированную систему саморегуляции в органах, тканях и на уровне целого организма.

Проявление регуляторных свойств авторы связывают с особенностями гидратации пептидов. Сочетание клатратных структур воды вокруг гидрофобных участков и гидратных структур около полярных групп позволяет наглядно представить единство молекулярной динамики пептида и его водного окружения. Статистический анализ аминокислотных последовательностей низкомолекулярных пептидов и регуляторных белков обнаружил в их структуре повторяющиеся олигопептидные блоки. Гипотеза, предложенная авторами, состоит в том, что эти блоки составляют основу взаимной индукции регуляторной активности олигопептидов и высокомолекулярных белков. В монографии также рассматриваются особенности взаимодействия пептидов с элементами цитоплазматической клеточной мембраны: рецепторами и фосфолипидными участками поверхности клетки. Выдвинуто предположение о том, что не только белковые рецепторы, но и внешний слой мембраны, представляющий собой сложный орнамент положительно и отрицательно заряженных полярных групп фосфолипидов, может исполнять роль клеточного рецептора. Пептиды вследствие своей полиамфолитной природы комплементарно взаимодействуют

только с определенным участком внешнего фосфолипидного слоя. Взаимодействие пептидов, в частности факторов транскрипции, с двойной спиралью ДНК также является актуальной проблемой. Авторами предложена модель комплементарности молекулярных поверхностей ДНК и регуляторного пептида на промотерных участках двойной спирали. Такой подход служит расширению представлений о специфичности локальных взаимодействий пептидных и нуклеотидных цепей.

В монографии рассмотрены некоторые молекулярные механизмы процессов возрастной инволюции органов и тканей организма. Авторами подчеркивается, что изменения, происходящие при старении, носят более функциональный, чем органический характер, что делает возможным их коррекцию. Универсальность системы пептидной саморегуляции на уровне всего организма сочетается с более узкой специфичностью их действия на тканевом уровне, т. е. с определенным уровнем тканеспецифичности регуляторных пептидов. Исследования, проведенные в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН, показали, что эндогенные регуляторные пептиды и нуклеопротеиновые комплексы являются эффективными лекарственными средствами для компенсации и нормализации определенных физиологических функций. Особое внимание в монографии уделено проблеме разработки и использования пептидных препаратов в геронтологии для профилактики ускоренного старения.

Авторы монографии сумели объединить представления о пептидах, фосфолипидах и ДНК, сложившиеся в области физической химии, биохимии и молекулярной биологии, и сформировать на этой основе новую концепцию, согласно которой фундаментальная роль в саморегуляции принадлежит регуляторным пептидам. Во всем диапазоне молекулярных масс — от дипептидов до высокомолекулярных белков — пептиды объединены информационными связями и поэтому действуют в координированной системе саморегуляции. На молекулярном уровне система регуляторных пептидов выполняет ту же роль, которую мозг выполняет на уровне целого организма.

Особенностью монографии является акцентирование роли системы водородных связей между пептидами и связанной водой. По-видимому, эти связи имеют особое значение в передаче молекулярной информации на клеточном и межклеточном уровне. Очевидно стремление авторов привлечь

внимание специалистов в области биофизики, физики и физики элементарных частиц к решению рассматриваемой проблемы, поскольку трансляция молекулярной информации по системе водородных связей должна быть основана на свойствах, присущих протонам как элементарным частицам.

Академик РАН И. П. Ашмарин

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время детально изучены строение, надмолекулярные структуры и функции наиболее важных компонентов живых клеток (пептидов, белков, углеводов, липидов и нуклеиновых кислот); установлена роль неорганических веществ в процессах клеточной физиологии; детально изучена взаимосвязь генетического кодирования и биосинтеза белков; подробно изучаются молекулярные механизмы клеточной пролиферации, дифференцировки и апоптоза; иными словами, уже сформирован научный базис для понимания феномена жизни.

Во многом развитие многочисленных областей биологии, биохимии и генетики определяется медицинскими задачами, в частности такими как заместительная терапия при гормональной или ферментной недостаточности; повышение иммунного потенциала организма в условиях вирусной или микробной инфекции либо стресса; лечение генетических заболеваний. В то же время накоплен обширный материал, свидетельствующий о существовании внутренних резервов организма для преодоления неблагоприятных внешних воздействий и выхода из патологических состояний. Поэтому современная медицина особое внимание уделяет изучению феномена гомеостаза¹ на всех структурных уровнях живой материи — на уровне клетки, органа и организма. Живая система удивительным образом способна привести себя в соответствие с изменениями внешней среды и при этом сохранить постоянство своей

¹ Гомеостаз — поддержание и восстановление внутренней среды организма при возникновении изменений, обусловленных внешними и внутренними воздействиями. Гомеостаз обеспечивается координированной деятельностью механизмов саморегуляции на молекулярном, субклеточном, тканевом и системном уровнях (Гальперин, Лазарев, 1986).

внутренней среды и основных функций, т. е. она обладает саморегуляцией.

Термин «саморегуляция» многозначен и включает в себя, в частности, понятие прямой и обратной связи системы с внешней средой посредством совокупности определенных сигналов. Например, саморегуляция в автоматических системах управления, в экономике и кибернетике осуществляется в соответствии с программой, изменение которой производится программистом извне. Внешняя программа работает надежно до тех пор, пока адекватно предусмотрено изменение внешних условий. Саморегуляция в биологических системах обеспечивается эндогенными корректировками программы (в том числе генетической) в соответствии с полученной информацией об изменениях внешней среды. Такие проблемы, как преобразование этих изменений в сигналы, восприятие сигналов и формирование адекватных реакций организма, исследуются методами биофизики, биохимии, физиологии и медицины. Однако эти науки не дают представления о механизмах согласования разнообразных функций и реакций целостного живого организма на разных уровнях организации.

В отличие от технических (искусственных) систем все процессы развития в биологических системах принципиально необратимы, характеризуются определенным направлением «от простого к сложному» и используют механизм самовоспроизведения для закрепления структур и функций, достигнутых на каждом этапе эволюции. Ранее было выдвинуто предположение, что «прогрессивная эволюция организмов строится на некоторых общих принципах: полимеризации, т. е. увеличении числа однородных компонентов; дифференциации, т. е. разнообразной специализации этих компонентов; интеграции, т. е. согласовании и объединении их функций в целостной организации». И далее: «...объединение линейной структуры нуклеиновых кислот с белковыми телами и поддержание подвижного равновесия в сравнительно устойчивой системе означало, очевидно, возникновение нового качества — возможности самовоспроизведения как основы жизненных процессов. Только таким путем всегда создавалось множество сходных индивидуальностей, послуживших материалом для отбора быстрее нарастающих, более устойчивых систем с более точным механизмом самовоспроизведения. Это и лежит в основе возникновения и эволюции живых существ. Вместе с тем уже в самых элементарных жизненных процессах проявляется и наличие ре-

гуляторных механизмов, поддерживающих состояние подвижного равновесия даже у наиболее простых живых существ. Простейшим регуляторным механизмом является механизм обратимых химических реакций. Их действие можно себе представить в виде замкнутого цикла процессов синтеза, распада и ресинтеза» (Шмальгаузен, 1961. С. 106). Количественное подтверждение этой биологической концепции появилось позднее, в 70-х годах.

Вторая половина XX столетия характеризуется исключительной интенсивностью развития теоретических направлений точных наук. И в первую очередь был решен вопрос об их точности. Теория познания унаследовала от XIX в. догмат о роли наблюдения в науке: считалось, что действия наблюдателя не изменяют хода событий. Развитие атомной и квантовой физики в XX в. показало, что всякое наблюдение представляет собой то или иное возмущение и воздействует на ход событий. Поэтому о большинстве явлений и процессов в области атомных и молекулярных размеров мы можем судить лишь с некоторой вероятностью. «В науке о жизни быстро устанавливается тот факт, что любое наблюдение возмущает наблюдаемый объект и что внешний мир не способен сохранить неизменной объективную структуру» (Бриллюэн, 1966. С. 83). Нужно отметить, что врачи и физиологи издавна придерживаются такой точки зрения.

Вопросам самоорганизации живых эволюционирующих систем посвящен ряд фундаментальных работ (Эйген, Шустер, 1982; Кеплен, Эссиг, 1986). Почти полвека развивается термодинамика неравновесных систем, основанная И. Пригожиным. Работами его школы определены условия возникновения упорядоченности и самоорганизации в открытых системах, обменивающихся веществом и энергией с окружающей средой. Изучение периодических реакций в химии привело этих исследователей к рассмотрению эволюции макромолекул (Эйген, Шустер, 1982). Им удалось проанализировать циклические процессы в явлениях катаболизма и создать математическую модель работы Лас-оперона. Таким образом, был намечен путь анализа регуляторных процессов в биологически возбудимых средах, путь к установлению иерархии динамических структур на клеточном уровне (Кеплен, Эссиг, 1986).

В то же время в области математической физики сформировалась теория нелинейных колебаний и уединенных волн (солитонов), которая была предложена для моделирования ряда биологических функций (Филиппов, 1990). В

частности, уравнение движения солитонов было использовано для описания возникновения и распространения нервного импульса, а также для описания коллективных возбуждений в α -спиральных структурах белковых макромолекул и трансляции энергии гидролиза АТФ вдоль пептидной цепи (Давыдов, 1984).

Одновременно в области теоретической биохимии П. Митчелл впервые ввел представление о векторной природе биохимических реакций и на этой основе разработал хемиосмотическую теорию мембранного транспорта (Mitchell, 1976). В качестве движущей силы транспорта он рассматривал градиенты электрохимических потенциалов химических групп, расположенных вдоль траектории переноса. Можно добавить, что его идеи мембранной асимметрии и векторной биохимии очень медленно осваивались сторонниками классической биохимии. Они нашли применение главным образом в эмбриологии и цитологии.

К настоящему времени молекулярная биология и генетика достигли уровня высокой технологичности, позволяющей манипулировать отдельными генами, устанавливать пространственную структуру белков, состоящих из сотен аминокислот, и осуществлять их направленный генно-инженерный биосинтез (Мещлер, 1980; Иванов, Берлин, 2000).

Тем не менее все эти достижения не объясняют, почему эволюционные биологические процессы обладают такой сокрушающей динамикой и непоколебимой устойчивостью, которые заставляют естествоиспытателей и философов включать тонкий слой хрупких и смертных существ в ранг явлений геологического или даже планетарного масштаба (Вернадский, 1988). Можно предполагать, что существует до сих пор не учитываемая в биологических (и тем более в молекулярно-биологических) теориях неразрывная взаимосвязь между открытой эволюционирующей системой и неравновесной окружающей средой. Именно эта взаимосвязь определяет гибкую программу саморегуляции и самосохранения живой системы.

В настоящее время на фоне многообразных теоретических достижений накоплен огромный объем биохимических исследований и клинических наблюдений, которые не только ставят фундаментальные вопросы биологии и медицины, но и способствуют их решению.

К концу 80-х годов принципиально изменились представления о физиологии биорегуляции: в частности, как отмечает И. П. Ашмарин, «качественно изменились и пред-

ставления о механизмах синаптической передачи, которая оказалась ареной сложного взаимодействия классических нейромедиаторов с регуляторными пептидами. По сравнению с другими системами межклеточной сигнализации пептидная система оказалась наиболее многочисленной, а сами пептидные регуляторы оказались особенно плейотропными, полифункциональными. Сформировалась концепция о функциональной непрерывности, регуляторном континууме, состоящем из пептидов и сопряженных с ними межклеточных сигнализаторов другой природы» (Ашмарин, Каменская, 1988).

Клинические и биохимические исследования показывают, что самый широкий спектр функций организма регулируется именно олигопептидами и пептидами,² которые часто (и неточно) называются пептидными гормонами. Эффективные концентрации этих веществ в живой клетке столь низки, что не позволяют предполагать их количественное участие в метаболизме. П. К. Климов предложил сигнальный механизм пептидной регуляции по принципу камертон—резонатор; при этом предполагается, что регуляторные пептиды (РП) выступают в роли камертона (Климов, Барашкова, 1993). Действие этого механизма в чем-то аналогично действию медиаторов нервной системы. Но если возникновение нервного импульса основано на электрохимическом воздействии на синаптическую мембрану, то физико-химические механизмы сигнального действия пептидов на клеточную мембрану пока не до конца выяснены. Одновременное рассмотрение большого объема экспериментальных исследований с двух точек зрения — с точки зрения физико-химических свойств пептидов и с точки зрения регуляции отдельных физиологических функций организма — помещает в фокус внимания вопрос о корреляции строения и биологической активности пептидов. Медико-биологические исследования лечебного действия РП показали, что им свойствен особый вид регуляции — тканеспецифическая модуляция. Установленный к настоящему вре-

² В данной работе термин «олигопептиды» будет употребляться, в соответствии с современными правилами (по аналогии с олигонуклеотидами), для обозначения коротких пептидных цепочек, содержащих от 2 до 10 аминокислотных остатков; термин «пептиды» — для цепочек из 10—20 аминокислотных остатков; термин «полипептиды» — для пептидных цепей, содержащих более 20 аминокислотных остатков. В отличие от белков пептиды и полипептиды, как правило, не имеют в растворе третичной структуры и не претерпевают необратимой денатурации.

мени механизм рецепторной передачи сигнала в клетку работает по принципу выключателя: «on—off». При этом интенсивность ответа на сигнал не нормируется. Регуляторные воздействия пептидов носят более мягкий и пролонгированный характер: они модулируют, т. е. изменяют по определенному временному закону, интенсивность уже существующих функций дифференцированной ткани в соответствии с ее нормальным состоянием.

Отсутствие классификации РП на основе их структуры и специфической активности привело к возникновению нескольких обобщающих, но не точных терминов. Например, термин «кинины» был предложен для широкой группы одноцепочечных полипептидов. К ним относили ангиотензины, брадикинины, секретин. Позднее возник термин «цитокины», обозначающий группу белков, которые выделяются одним типом клеток и действуют на определенные рецепторы других клеток (Ярилин, 1999). При этом реакции воспринимающих клеток могут быть разнообразны. Полипептиды, выделяемые лимфоцитами, были названы лимфокинами, выделяемые клетками моноклеарной фагоцитарной системы, — монокинами и т. д. В настоящее время к цитокинам относят гуморальные регуляторы — гликопротеины, влияющие в пико- и наномолярных концентрациях на рост и дифференциацию индивидуальных клеток и тканей. К ним относят интерфероны, интерлейкины, факторы некроза опухолей, ростовые факторы и др. (Ляшенко, Уваров, 2001). Разнообразие структур, физико-химических свойств и физиологических проявлений на фоне токсичности при клиническом применении затрудняет классификацию этих эндогенных регуляторных макромолекул по их специфической активности *in vitro*.

Особый класс биорегуляторов составляют тканеспецифические пептиды — цитомедины (Морозов, Хавинсон, 1983, 1996); в ряде работ проведено сравнение цитомединов с цитокинами (Хавинсон, Жуков, 1992; Кузник и др., 1999). Согласно предложенной классификации, каждая нормальная дифференцированная ткань синтезирует и в небольших количествах выделяет в гуморальную среду свои специфические пептиды — цитомедины, которые, с одной стороны, контролируют функции данной ткани, а с другой — являются молекулярными сигналами, которые информируют весь организм о том, что данная ткань работает нормально, и соответственно блокируют возможные механизмы компенсации определенных функций (Хавинсон, Жуков, 1992).

Некоторые свойства цитомединов — их тканеспецифичность, отсутствие видовой специфичности и способность ингибировать пролиферацию — сближают их с эндогенными регуляторами класса кейлонов. Однако цитомедины имеют невысокие молекулярные массы и более устойчивы в гуморальной среде.

Работы по выделению и исследованию цитомединов, их клинические испытания и широкое медицинское применение проводятся более 30 лет. И хотя в академическом смысле срок исследования не является параметром научности, в практически значимых областях (в частности, в клинической практике) он, как правило, коррелирует с количеством независимых воспроизведений и проверок. Цитомедины имеют сравнительно простую структуру, так что их олигопептидные аналоги, полученные встречным синтезом, проявляют такую же активность и тканеспецифичность, как и природные препараты (Кузник и др., 1999).

Проблема тканеспецифичности до последнего времени рассматривалась на макроуровне. Иначе говоря, РП выделяли из определенных органов и тканей, пренебрегая неоднородностью клеточных популяций, составляющих каждый орган. С помощью современных методов гистохимии доказано существование в организме диффузной системы нейроэндокринных клеток — APUD-системы (названной по первым буквам английских слов Amine Precursors Uptake and Decarboxylation), специфическими функциями которой являются поглощение и декарбоксилирование предшественников, а также синтез биогенных аминов, таких как мелатонин и гистамин (Райхлин и др., 1993). Эти клетки, кроме того, продуцируют широкий спектр РП для локальной саморегуляции дифференцированной ткани и для гуморальной передачи в ЦНС сигнала о состоянии органа.

Сопоставление регуляторных пептидов, выделенных из разных тканей, с пептидами, выделенными из мозга, позволило увидеть не только их структурное подобие (гомологичность олигопептидных блоков и характерное чередование гидрофильных и гидрофобных боковых групп), но в ряде случаев и полную их идентичность. П. К. Климов подчеркивал интегрирующее значение пептидов мозга для поддержания общего гомеостаза организма: «Головной мозг постоянно синтезирует и содержит, за немногим исключением, все регуляторные пептиды, что послужило основанием назвать мозг большим эндокринным органом» (Климов, Барашкова, 1993. С. 80). Это объясняет огромное число работ, посвя-

щенных анализу и синтезу пептидов мозга, которые могут быть использованы в медицинских целях для восстановления отдельных функций и саморегуляции организма. Для практической медицины синтетические пептиды привлекательны тем, что они по структуре идентичны природным эндогенным регуляторам (или являются их модификациями), не вызывают побочных эффектов и вполне доступны для масштабного производства.

Если же взглянуть на ситуацию изучения пептидов мозга с другой стороны, т. е. со стороны теории познания, то она во многом отличается от стандартной научной постановки эксперимента по схеме «вопрос—ответ». Эта деятельность человека направлена не столько на «объективную реальность, данную нам в ощущениях», сколько на осмысление молекулярных механизмов собственного мышления, рефлексии, памяти и поведения.

Когда биохимик анализирует химические структуры пептидов мозга, оценивает их и старается понять механизм действия, его персональные интеллектуальные усилия обеспечиваются этим самым механизмом. Это пример взаимодействия (пока теоретически не учтенный) живой системы с внешней средой. Стремясь к самоидентификации, континуум нейропептидов и медиаторов активно участвует в построении внутреннего отображения внешней среды и себя в этой среде. Рефлексия такого уровня является не столько психологическим феноменом, сколько гносеологическим инструментом. Без самоидентификации, т. е. без способности отделить себя от окружающей среды и различать «свое и чужое», «часть и целое», «свойство и его меру», невозможна саморегуляция открытой системы, будь то полифункциональная макромолекула или организм на высокой ступени эволюции.

Самопознание переводит первобытные представления людей о своем здоровье, основанные на отсутствии ощущения нездоровья, на уровень осознанного самосохранения. Из вечного борца с природой, в том числе со своей собственной природой, человек превращается в разумного хозяина своего организма. Таким образом, саморегуляция, существующая на уровне бессознательного, генетически запрограммированного молекулярного механизма, может быть дополнена осознанной и продуманной стратегией сохранения здоровья, поддержания собственного гомеостаза в условиях стресса или старения. За счет обеспечения адекватной научной информацией, путем интеллектуальной и социальной интегра-

ции человек как биологический вид приобретает дополнительные адаптивные способности к тем условиям, которые не предусмотрены природной генетической программой.

Вышеизложенное объясняет, почему в нашей работе основное внимание уделено строению и свойствам именно пептидов, т.е. тех информационных молекул, которые совмещают множество функций в компактной упаковке полипептидной цепи, в частности воспринимают изменения внешней и внутренней среды, формируют информационные сигналы, передают их клеткам, осуществляют обратную связь и тем самым поддерживают саморегуляцию организма.

Обобщение этих данных с привлечением методов физической химии и термодинамики и использование полученных обобщений ориентирует медицинскую биохимию и фармакологию на разработку новых препаратов класса РП для восстановления жизненных функций травмированного или стареющего организма.

ПЕПТИДЫ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

1.1. Особенности строения аминокислот и олигопептидов

Как известно, белки состоят из α -аминокарбоновых кислот, обычно называемых аминокислотами. Их структуры представлены в любом учебнике биохимии или справочнике. В растительном и животном мире к настоящему времени обнаружено более 100 аминокислот различного строения, но только 20 из них кодируются генетическим кодом, т. е. для каждой из этих 20 аминокислот имеется определенное сочетание нуклеотидных звеньев (кодонов), которое определяет место аминокислоты в полипептидной цепи при рибосомальном синтезе. В настоящей монографии мы рассмотрим только кодируемые аминокислоты, которые составляют основу биологических процессов на Земле. Их строение имеет определенные пространственные и электрохимические особенности.

1. Все аминокислоты, кроме глицина, обладают хиральностью, т. е. имеют две зеркально симметричные пространственно несовместимые формы L и D (рис. 1, А). Аминокислоты, входящие в состав природных пептидов и белков, имеют, как правило, L-форму; исключения встречаются в пептидных антибиотиках животного происхождения (Kreil, 1997).

2. Аминогруппа имеет явно выраженный основной характер, а карбоксильная группа — кислый: для глицина значения константы кислотной диссоциации (pK_a) равны 9.6 и 2.3 соответственно. В водном растворе в физиологических условиях протон карбоксильной группы переходит к аминогруппе (рис. 1, Б) и молекула превращается в цвиттерион (Полинг, 1964). Благодаря фиксированному в пространстве расположению положительного и отрицательного зарядов аминокислоты в воде имеют постоянный дипольный момент.

3. R — боковые группы аминокислот (рис. 1, А) имеют широкий диапазон гидрофильных и гидрофобных свойств

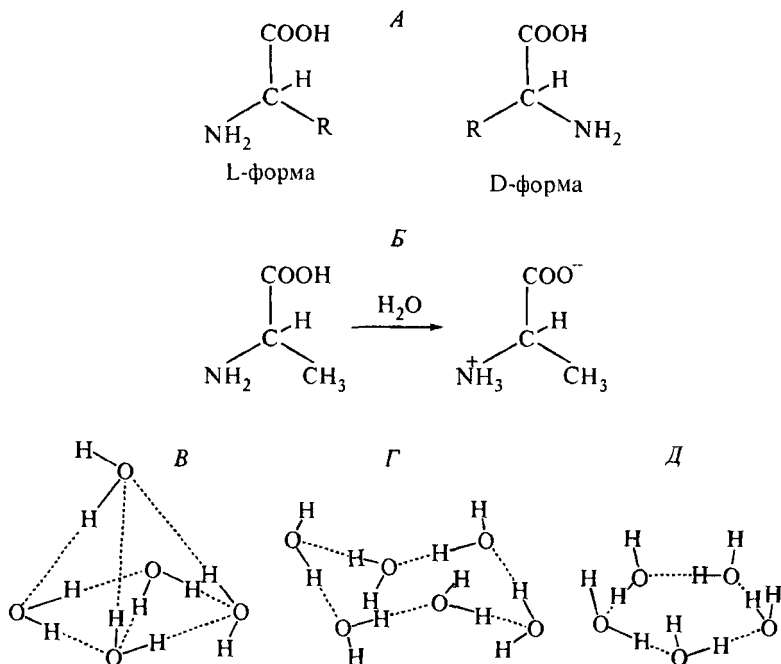


Рис. 1. Пространственные структуры аминокислот и водного окружения. А — стереоизомеры α-карбоновых аминокислот, где R — боковая группа; Б — цвиттер-ионная структура L-аланина в водном растворе при pH 7.0. В—Д — координация молекул воды с помощью водородных связей, определяющая гидратацию гидрофильных и гидрофобных частей аминокислот и белков: в воде (В), в структуре льда (Г) и в клатратах (Д).

(табл. 1), которые определяют межмолекулярные взаимодействия аминокислот. Боковые группы лизина и аргинина проявляют свойства сильных оснований (значения pK_a равны 10.5 и 12.5 соответственно); боковые группы аспарагиновой и глутаминовой кислот проявляют выраженные кислотные свойства (pK_a равно 3.6 и 4.2 соответственно).

4. Сочетание в структуре аминокислот протон-донорных и протон-акцепторных групп обеспечивает их участие в водородных связях с другими молекулами, в частности с молекулами растворителя.

Гидрофобность является свойством неполярных молекул и химических групп, она отражает их тенденцию растворяться в неполярных растворителях. В то же время эти неполярные молекулы практически не растворяются в воде и не смешиваются с ней. Среди неорганических веществ гидрофобными считаются благородные газы, среди органиче-

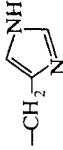
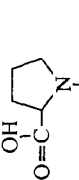
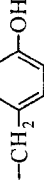
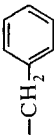
ских — углеводороды и их производные. Мерой гидрофобности вещества принято считать его коэффициент распределения между органическим растворителем и водой; Тенфорд использовал в качестве такого органического растворителя этанол, Мак-Грегор — 2-бутанол. Это разделило аминокислотные остатки на три сорта: гидрофильные, гидрофобные и те, которые одинаково распределяются между органической и водной фазами. Наиболее полная систематизация гидрофильно-гидрофобных характеристик принадлежит Ганшу, который применял в качестве неполярного растворителя октанол (Leo et al., 1971). Мы использовали из его обзора данные о коэффициентах распределения аминокислот между октанолом и водой для вычисления свободной энергии переноса (G) аминокислоты из воды в октанол. При этом самой гидрофильной аминокислотой является глицин — цвиттерион, не имеющий боковой группы, с собственным дипольным моментом 20 Д.³ Для его перемещения из воды в октанол требуется затратить 17.4 кДж/моль. Все остальные аминокислоты более гидрофобны и перемещаются в неполярное окружение с меньшими затратами энергии. Принимая гидрофобность остатка глицина за 0, можно оценить гидрофобность боковых групп других аминокислот. В табл. 1 представлены расчетные значения свободной энергии перемещения боковой группы аминокислоты из воды в октанол, т. е. из полярного растворителя в неполярный. Эта шкала гидрофобности аминокислотных остатков обнаруживает, что все они в той или иной степени гидрофобны, хотя для большинства из них энергия перемещения в неполярное окружение невелика и соизмерима с тепловой энергией: $RT = 2.58$ кДж/моль при 37 °С (здесь R — газовая постоянная, T — температура). В дальнейшем мы будем использовать эту шкалу гидрофобности при оценке межмолекулярных взаимодействий пептидов друг с другом и с другими компонентами клетки — фосфолипидами и нуклеиновыми кислотами, хотя при теоретических расчетах оптимальных конформаций белков наиболее часто используется упрощенная шкала Тенфорда.

Аминокислотные остатки существенно различаются по парциальным молярным объемам в гидратированном состоянии (табл. 1). Самые высокие значения молярных объемов принадлежат самым гидрофобным аминокислотам — тиро-

³ Дебай (Д) — несистемная единица молекулярного дипольного момента: $1 \text{ Д} \approx 3.3 \cdot 10^{-30} \text{ К} \cdot \text{м}$.

Таблица 1

Аминокислоты, кодируемые ДНК (по: Leo et al., 1971; Замятнин, 1973)

Наименование	Однобуквенный символ	Молекулярная масса, Да	Боковая группа R	Гидрофобность боковой группы (-G), кДж/моль	Объем аминокислотного остатка в воде, см ³ /моль
Глицин	G	75	-H	0	36.1
Аланин	A	89	-CH ₃	0.5	53.2
Валин	V	117	-CH(CH ₃) ₂	5.3	83.9
Лейцин	L	131	-CH ₂ -CH(CH ₃) ₂	7.5	100.1
Изолейцин	I	131	-CH(CH ₃)-CH ₂ -CH ₃	7.5	100.1
Гистидин	H	155	-CH ₂ - 	1.0	91.9
Пролин	P	143		3.0	73.6
Тирозин	Y	181	-CH ₂ - 	4.4	116.2
Фенилаланин	F	165	-CH ₂ - 	9.1	113.9

Триптофан	W	204		11.3	136.7
Серин	S	105	$-\text{CH}_2-\text{OH}$	1.3	53.4
Треонин	T	119	$-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_3$	5.8	69.7
Цистеин	C	121	$-\text{CH}_2-\text{SH}$	—	65.1
Метионин	M	135	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3$	5.9	97.7
Аспарагин	N	132	$-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2$	0.8	70.6
Глутамин	Q	146	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2$	1.9	86.3
Аспаргиновая кислота	D*	133	$-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{OH}$	4.1	66.7
Глутаминовая кислота	E*	147	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{OH}$	3.9	83.0
Лизин	K*	146	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$	1.2	101.1
Аргинин	R*	159	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}_2$	2.5	104.1

* Аминокислоты в протонированной форме.

зину, фенилаланину и триптофану, превосходя значения мольных объемов остатков гидрофильных глутаминовой и аспарагиновой кислот, лизина и аргинина, несущих электрические заряды на боковых группах (Замятнин, 1973).

Измерение гидрофобности органических соединений имеет давнюю традицию, так как фармакологи еще в начале XX в. отмечали корреляцию между гидрофобностью и физиологической активностью токсинов, нейролептиков и наркотических веществ. Предполагалось, что липидные структуры клеточных мембран и миелиновые структуры нервных волокон представляют собой неполярную фазу, куда с высокой селективностью распределяются гидрофобные молекулы. Только позднее Л. Полинг предположил, что в осуществлении физиологических межмолекулярных взаимодействий определяющую роль играет структура гидратационной воды (Pauling, 1961).

В настоящее время экспериментально установлено, что вода — неотъемлемый участник всех биологических процессов на Земле. Структура и подвижность воды составляют основу подвижности всех других компонентов живых систем. Среднее весовое содержание воды в клетках млекопитающих составляет 70 %; на долю белков и фосфолипидов приходится 18 и 3 % соответственно. На все остальные компоненты живой клетки приходится только 9 % ее веса.

Молекула воды имеет геометрию практически равнобедренного треугольника. Расстояния между ядром атома кислорода и протонами равно 0.96 Å. Кристаллографический диаметр молекулы воды равен 2.8 Å. В жидкой воде каждая молекула воды связана с двумя соседними, как это представлено на рис. 1, В—Д. Центральный атом кислорода участвует в четырех водородных связях: в двух из них он донор электронов, в двух других — акцептор. Угол в системе О...Н—О близок к 180°. Такая структура определяет высокую полярность молекулы воды: ее собственный дипольный момент равен 1.84 Д.

Структура молекулы воды и ее межмолекулярные водородные связи играют ключевую роль при гидратации растворенных веществ, в частности пептидов и белков. Вокруг полярных и неполярных групп в воде возникают различные типы гидратационных оболочек. Около неполярных (гидрофобных) групп, не способных к участию в водородных связях, выстраивается ажурная ячейка из молекул воды, связанных только друг с другом, как это проиллюстрировано на рис. 1, Г и Д. Шестичленные изогнутые циклы и нена-

пряженные плоские пентагоны с углами 108° формируют пространственные многогранники, состоящие из триплетных и более объемных структур с кубической симметрией, — ячейки, внутри которых размещается гидрофобная молекула (Адамсон, 1984). Структуры с таким типом координации молекул воды получили название «клатраты», т. е. клеточные гидраты (Габуда, 1982), и были отнесены к классу соединений включения. Эти ажурные рыхлые гидратные структуры имеют среднюю плотность 0.79 г/см^3 , тогда как плотность обычного льда составляет 0.92 г/см^3 . Клатраты устойчивы только при наличии в полостях каких-либо молекул или атомов, не способных участвовать в водородных связях, так что количество клатратной воды оказывается максимальным для гидратов гидрофобных веществ (Замятин, 1973). Не все клатратные структуры воды являются электронейтральными: в пятизвенных циклах дипольные моменты молекул воды направлены наружу по отношению к заключенной в ячейке молекуле (рис. 1, Д).

Для каждого типа таких клатратных соединений имеется критическая температура, выше которой они разрушаются, как бы плавятся, и этот «фазовый» переход наблюдается как эндогенный термический эффект при дифференциальном термическом анализе.

В конце 50-х годов Полинг показал, что вода может формировать комплексные соединения с углеводородами (например, $\text{CH}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) и с углеводородными частями биологически активных молекул, в частности с анальгетиками. Ему принадлежит гипотеза о том, что сочетание полярной (или электрически заряженной) группы с гидрофобными частями молекулы лежит в основе взаимодействия анальгетиков и нейротоксинов с клеточными мембранами (Pauling, 1961).

Если аминокислотный остаток несет электростатический заряд или взаимодействует с молекулами воды как донор или акцептор водородной связи, то вокруг него образуется более плотный слой гидратационной воды, имеющий льдоподобную структуру. Дипольные моменты молекул воды в этом слое ориентированы под действием локального электростатического поля гидратируемой группы (рис. 1, Д). Ионизация карбоксильной или аминогруппы аминокислоты приводит к изменению типа гидратации от клатратного до гидратного, что отображается в системе водородных связей ближайшего окружения. Расчет энергии ассоциации молекул воды с заряженными центрами показал, что знак заряда

частицы влияет на вектор поляризации водного окружения (Русанов, 1978). Радиус сольватации r также зависит от знака и плотности электрического заряда гидратируемой группы в ряду: $r^+ < r^- < r_2^- < r_2^+$. Например, при конденсации паров воды конденсирующая активность отрицательных ионов на порядок выше активности положительных ионов. По этой причине капли дождя имеют отрицательный избыточный вектор поляризации поверхности, а потенциал атмосферы сохраняет положительное значение.

Изучение динамики гидратационной воды около участков молекулы с разной полярностью позволяет определить границы областей гидратной оболочки, различающихся ориентацией и плотностью упаковки молекул воды (Okouchi et al., 2002).

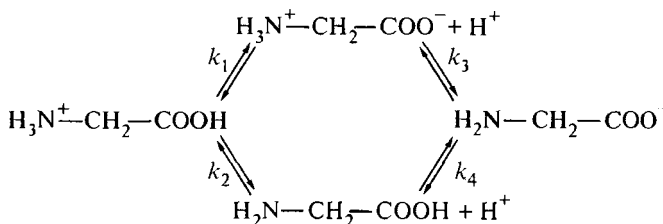
Ионизация простой органической кислоты (например, уксусной) имеет только один этап депротонирования, который приводит к возникновению отрицательного заряда на карбоксильной группе:



Равновесие такой реакции определяется единственной константой кислотной диссоциации:

$$K_a = [\text{RCOO}^-] [\text{H}^+] / [\text{RCOON}].$$

Кислотная диссоциация (депротонирование) цвиттерионов осуществляется как более сложный, многоступенчатый процесс, при этом константы равновесия на каждом этапе зависят от пути диссоциации всей молекулы. Диссоциация простейшей аминокислоты — глицина — может быть представлена следующей схемой (Чанг, 1980):



где k_1 , k_2 , k_3 и k_4 — микроскопические константы диссоциации, связанные термодинамическим соотношением:

$$k_1 k_3 = k_2 k_4.$$

Однако экспериментально можно определить только две константы ионизации: $K_1 = k_1 + k_2$ — для карбоксильных групп; $K_2 = k_3k_4/k_3 + k_4$ — для аминогрупп.

Расчеты, выполненные на основе данных потенциометрического титрования глицина, показывают, что в зависимости от пути ионизации молекулы (изменение pH от кислых значений к щелочным или наоборот) микроскопические константы диссоциации аминогруппы (k_2 и k_3) различаются на два порядка. Изменение ионизации той или иной группы влияет на взаимодействие этой группы с ближайшим окружением, меняя соотношение клатратной и гидратной структур в связанной воде.

Физико-химические свойства аминокислот и их полифункциональность важны для осуществления многочисленных регуляторных функций этих веществ в живых организмах. Индивидуальные аминокислоты, их производные (пептиды) и продукты метаболизма (аммиак, мочевины, ароматические амины) служат, в частности, медиаторами нервных окончаний, сигналами связи с внешней средой, ингибиторами отдельных биохимических реакций, являются адаптогенами и основой для синтеза нейропептидов и гормонов (Кричевская и др., 1983). Плазма крови представляет собой их депо и обеспечивает транспорт аминокислот к определенным органам.

Фонд свободных аминокислот в клетках живых организмов имеет эволюционную, органную и тканевую специфичность. Например, аминокислотный состав мозга существенно отличается от состава других органов и тканей присутствием избыточного количества дикарбоновых кислот и их амидов: они составляют две трети от общего количества аминокислот в мозге всех видов животных. Глутамин, аспарагин и их остатки в составе пептидов в организме неферментативно гидролизуются до соответствующих дикарбоновых кислот. В связи с этим важно отметить, что белки молодых клеток характеризуются более высокой степенью амидированности, чем белки стареющих клеток (Пушкина, 1977).

Четыре ароматические аминокислоты — гистидин, тирозин, фенилаланин и триптофан обладают повышенной химической активностью боковых групп. Она определяется системой сопряженных связей и делокализованных электронов и способностью этих групп участвовать в реакциях нуклеофильных и электрофильных замещений. Ароматические аминокислоты составляют основу многих биологически активных производных: гормонов, медиаторов, коферментов.

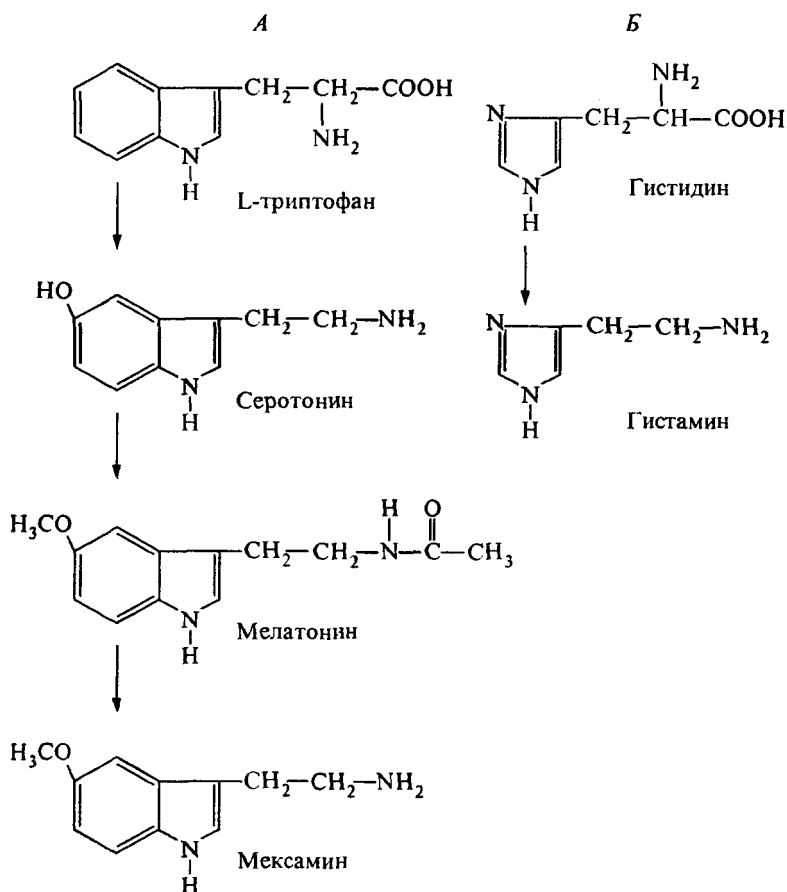


Рис. 2. Пути трансформации аминокислот в молекулярные регуляторы биологических функций.

А — преобразование триптофана: серотонин — нейромедиатор, возбуждающий постганглионарные нервные волокна; мелатонин — гормон эпифиза; мексамин — радиопротектор. **Б** — преобразование гистидина в гистамин — биологически активный амин, обладающий гормональным действием и медиаторными функциями.

На рис. 2 представлены примеры таких превращений триптофана и гистидина.

Триптофан является незаменимой аминокислотой и в природе синтезируется микроорганизмами. Суточная потребность человека в триптофане составляет 250 мг, а недостаток триптофана переносится тяжелее, чем голод. Собственно триптофан обладает широким спектром физиологической активности и положительно влияет на липидный обмен и

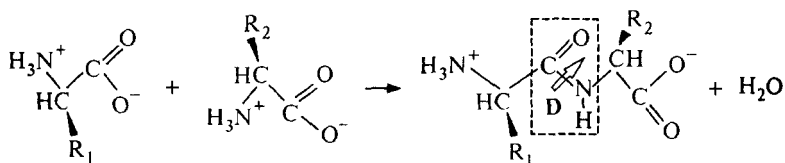
на синтез белков в печени. В малых дозах триптофан обнаруживает гипогликемический эффект, но при больших дозах этот эффект меняется на противоположный. Например, диабетогенное действие триптофана наблюдалось на крысах при скормливании дозы 2.5 г на 1 кг массы тела, что в 700 раз выше нормы суточного потребления (Рудзит, 1981). В дальнейшем мы увидим, что несколько пептидных гормонов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), стимулирующих выделение инсулина, содержат триптофан в своих активных детерминантах (Приложение, табл. II). Можно предполагать, что свободный триптофан в сверхвысоких дозах выступает конкурентом (антагонистом) этих гормонов и ингибирует специфические рецепторы на поверхности клеток, секретирующих инсулин.

Гистидин также является незаменимой аминокислотой. Его регуляторные функции определяются химическими свойствами боковой группы — имидазола. В частности, эта группа участвует в окислительно-восстановительных реакциях и способна устанавливать координационные связи с переходными металлами. В свободном состоянии гистидин содержится в тканях в очень низкой концентрации. В то же время он входит в каталитические (активные) центры многих ферментов (рибонуклеаза, химотрипсин, конвертаза) и регуляторных пептидов (карнозин, гистатин, нейрокинины) благодаря донорно-акцепторным свойствам своей имидазольной группы. Декарбоксилирование гистидина приводит к образованию гистамина — медиатора, который регулирует сосудистое давление, проницаемость капилляров и аллергические реакции. Как медиатор гистамин имеет три вида клеточных рецепторов, в том числе в клетках головного мозга.

Иначе говоря, диапазон регуляторных функций аминокислот и их производных обеспечивается их физико-химической полифункциональностью и участием в обратимых биохимических реакциях.

Как уже указывалось, аминокислоты в водной среде являются биполярными ионами, и образование между ними пептидной связи в водных растворах оказывается термодинамически невыгодным процессом. Синтез пептидов традиционно проводят в органических растворителях после предварительной защиты тех групп, которые не участвуют в образовании пептидной связи. В зависимости от длины и компонентного состава полипептида выбирается оптимальная стратегия его синтеза: жидкофазный, твердофазный или рекомбинантный (Andersson et al., 2000).

Образование пептидной связи может быть представлено следующей схемой:



В полученном дипептиде свободная электронная пара азота сопряжена с двойной связью карбонильной группы, так что связь $\text{C}-\text{N}$ отчасти сдвоена и вращение вокруг нее затруднено. Пептидная связь имеет постоянный дипольный момент D . Боковые группы R_1 и R_2 определяют комбинацию физико-химических свойств, присущих исходным индивидуальным аминокислотам. Как известно, при всех превращениях, если не происходит разрыва связи у асимметричного атома, конфигурация молекулы сохраняется. Поэтому при образовании пептидной связи сохраняются основные свойства исходных аминокислот: 1) оптическая активность, обусловленная хиральностью строения аминокислотных остатков; 2) способность участвовать в межмолекулярных водородных связях.

Однако при объединении аминокислот в молекулу пептида для каждой частной аминокислотной последовательности складывается индивидуальное соотношение гидрофильности и гидрофобности боковых групп пептида (Alberts et al., 1994).

Пространственное распределение разноименных электрических зарядов и дипольный момент пептидной связи, равный 3.5 Д, определяют постоянный дипольный момент и высокую поляризуемость пептида. Благодаря этим приобретенным свойствам дипептиды имеют более широкий спектр энергетических состояний, чем индивидуальные аминокислоты, что, однако, компенсируется уменьшением пространственных степеней свободы системы. Каждая из простых молекул имеет в растворе 6 степеней свободы движения: 3 вращательные и 3 поступательные. Две не взаимодействующие друг с другом аминокислоты имеют 12 степеней свободы; при их объединении в один дипептид число степеней свободы уменьшается до 6. С точки зрения статистической термодинамики, это равнозначно увеличению порядка в системе и соответствующему уменьшению энтропии.

Следует отдельно остановиться на принципиально новом качестве, которое приобретают аминокислоты, объединяясь в полипептидную цепь. Это качество — комплементарность подвижных конформаций.

Общее понятие комплементарности (дополнительности) относится к категориям ранних натурфилософских представлений. В эпоху развития алхимии сформировались два описательных представления: «подобное к подобному» и «противоположности сближаются». Первое опиралось на опыт разделения и очистки веществ, второе — на опыт химических превращений, при которых элементы с противоположными качествами взаимодействуют и дополняют друг друга. На современном уровне представлений о строении веществ принцип «подобное к подобному» воплотился в теорию гидрофильно-гидрофобных взаимодействий, а комплементарность иллюстрируется как притяжение положительных и отрицательных зарядов (в электростатике), как совмещение выпукло-вогнутых поверхностей, как взаимное соответствие элементов объекта и его зеркального отражения (матричная комплементарность ранней полиграфии). Во всех этих примерах «противоположности» рассматриваются как неизменные объекты.

Биологические макромолекулы, в частности пептиды, сохраняют комплементарность межмолекулярных взаимодействий в достаточно широком диапазоне конформаций. Эта их способность лежит в основе каталитической активности ферментов, и модель комплементарного взаимодействия «ключ—замок» была впервые использована на заре энзимологии. Позднее эта же модель использовалась при обсуждении специфичности связывания антигена с антителом и селективности взаимодействия рецептора с лигандом.

При исследовании нуклеиновых кислот была впервые использована модель матричной комплементарности нуклеотидных пар. С ее помощью было доказано, что эти макромолекулы управляют точным копированием собственной структуры, так как исходная макромолекула является матрицей для образования следующей.

Принцип матричной комплементарности очень прост и элегантен. Он состоит в том, что каждый элемент упорядоченной молекулярной конструкции (электростатический заряд, протон-донорная или гидрофобная группа) в том же порядке копируется на другую макромолекулу, элементы которой комплементарны элементам первой молекулы.

При ближайшем рассмотрении матричная комплементарность была обнаружена и при синтезе пептидов, и при формировании фосфолипидных бислойных мембран, и при самосборке полимеров (Conjugated oligomers..., 1998).

1.2. Физико-химические особенности пептидов

1.2.1. Гидрофильно-гидрофобные свойства олигопептидов

Как уже указывалось, диссоциация цвиттерионов, в частности пептидов, протекает как сложный многоступенчатый процесс, который характеризуется несколькими константами ионизации. Изменение заряда одной ионогенной группы не только влияет на ее взаимодействие с неорганическими противоионами (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}), на поляризуемость и суммарный дипольный момент пептида, но и изменяет, как указывалось выше, ориентацию молекул окружающей воды и смещает баланс между гидратной и клатратной гидратацией всей молекулы. Таким образом, диапазон биологической активности дипептидов расширяется за счет более высокой чувствительности к изменению ионной силы и кислотности окружающей среды: их активность в организме проявляется при меньших молярных концентрациях, но с большей селективностью по сравнению с отдельными аминокислотами.

Для примера можно рассмотреть строение и регуляторные свойства трех дипептидов: карнозина, тимогена и виллона, которые подробно описаны в литературе (Хавинсон, Жуков, 1992; Кузник и др., 1998; Hipkiss et al., 1998; Морозов и др., 2000б).

Карнозин

Дипептид карнозин (β -аланил-гистидин) впервые был выделен из мышечной ткани, а затем обнаружен во всех иннервированных тканях в концентрации до 20 мМ. На рис. 3 представлена его молекулярная структура, особенность которой состоит в сочетании имидазольного кольца гистидина на С-конце молекулы с β -аминогруппой — на другом конце. Эта аминогруппа в β -положении расположена достаточно далеко от плоскости пептидной связи и поэтому сохраняет более высокую подвижность при свободе вращения во-

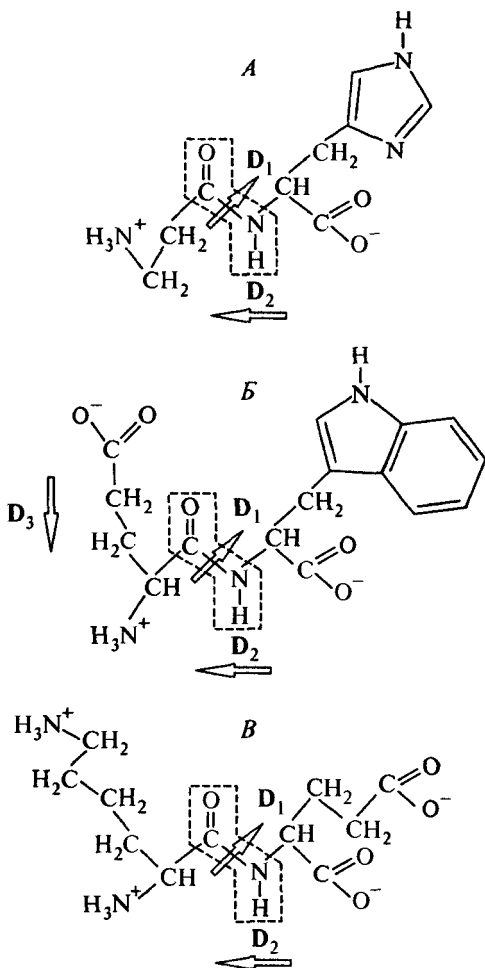


Рис. 3. Структурные формулы карнозина (А), тимогена (Б) и вилона (В).

В рамке — плоскость пептидной связи, которая находится в плоскости страницы. Стрелками обозначены дипольные моменты D пептидной связи и боковых групп. Вектор локального дипольного момента направлен от отрицательного заряда к положительному.

круг С—С- и N—С-связей, чем аминогруппа в α -положении. Нужно отметить особые свойства имидазольного кольца гистидина. Для свободного гистидина константа диссоциации этой боковой группы $pK_a = 6.0$, т. е. эта группа слабее, чем вода ($pK_a = 7.0$), ассоциирует протон (Чанг, 1980). Однако два атома азота (N^π и N^+) различаются по удаленности от основной пептидной цепи и по электрон-донор-

ным свойствам. В результате изменение степени диссоциации одного из них сопровождается перемещением электронной плотности по кольцу и обеспечивает участие гистидина в лигандных и окислительно-восстановительных взаимодействиях, когда его α -аминогруппа включается в пептидную связь. Возможно, поэтому карнозин благоприятно влияет на гликолиз и окислительное фосфорилирование, увеличивая количество образующегося АТФ. Кроме того, карнозин увеличивает эффективность активного транспорта K^+ и Na^+ через цитоплазматическую мембрану.

В печени, надпочечниках, селезенке и в секрете слизистой тонкого кишечника находится фермент карнозиназа, расщепляющий карнозин на β -аланин и гистидин. Известно, что карнозин препятствует перекисному окислению липидов, активирует восстановление поврежденных тканей, эффективен при лечении старческой катаракты. В настоящее время для этой цели препарат карнозина выпускается в виде глазных капель.

Сравнительно недавно было показано, что карнозин также защищает мозговую ткань от образования амилоидозных отложений белка. Амилоидоз — системное заболевание, характеризующееся отложением белково-углеводных комплексов в межклеточном пространстве нервной ткани. Кроме ассоциации пептидных фрагментов в этом процессе важную роль играет сшивка пептидных фибрилл альдегидными группами редуцирующих сахаров и малоновым диальдегидом, который является вредным конечным продуктом окисления липидов. Защитный эффект карнозина при амилоидных перерождениях ткани обеспечивается, по-видимому, электрон-акцепторной активностью имидазольного кольца, препятствующей перекисному окислению. Однако эта активность проявляется только после включения гистидина в состав дипептида, имеющего значительный дипольный момент и пространственную стабилизацию кольца относительно этого диполя. Свободный гистидин такой активностью не обладает (Alberts et al., 1994). Определенную роль в дестабилизации амилоидных отложений, возможно, играет и β -структура аланина (Iverson, 1997).

Тимоген

Дипептид тимоген (L-глутамил-L-триптофан) был впервые выделен из олигопептидных фракций препаратов тимуса. После того как была обнаружена его активность в от-

ношении стимуляции Т-лимфоцитов, этот дипептид был получен химическим синтезом и в настоящее время широко применяется в медицине (Морозов, Хавинсон, 1996; Кузник и др., 1998; Морозов и др., 2000б). Его структура представлена на рис. 3.

Карнозин и тимоген сочетают в структуре гидрофильную и гидрофобную части, которые в водном растворе располагаются с разных сторон от плоскости пептидной связи. Гидрофильные группы этих дипептидов (левые части молекул, изображенных на рис. 3) различаются знаком заряда: у карнозина это положительно заряженная аминогруппа, у тимогена — отрицательно заряженная карбоксильная группа. Если остаток глутаминовой кислоты тимогена не находится в пирроформе, то его молекула имеет два локальных противоположно ориентированных дипольных момента: между С- и N-концами дипептида (D_2) и между α -амино- и карбоксильной группами остатка глутаминовой кислоты (D_3). Таким образом, суммарный постоянный дипольный момент у тимогена оказывается меньше, чем у молекулы карнозина.

Отличительная особенность молекулы тимогена состоит в том, что она сочетает самый гидрофильный (глутамил) и самый гидрофобный (триптофан) аминокислотные остатки. Наличие триптофана отличает тимоген от всех известных пептидных регуляторов тимической системы и сближает его с нейропептидами класса нейромединов и пептидов-либеринов. В то же время тимоген обладает всеми иммуномодулирующими свойствами тималина, но значительно превосходит последний по удельной активности (Хавинсон, Жуков, 1992). Исследования показали, что тимоген *in vitro* способствует регенерации специфических рецепторов Т- и В-лимфоцитов и активации моноклеарно-фагоцитарной системы (Морозов, Хавинсон, 1997; Киселева и др., 1999), а *in vivo* у больных с вторичным иммунодефицитом он нормализует содержание Т-хелперов, Т-супрессоров и В-лимфоцитов (Кузник и др., 1999; Морозов и др., 2000б).

По-видимому, сочетание большой гидрофобной боковой группы триптофана и компенсированной диполярности облегчает взаимодействие тимогена с гидрофобными участками клеточных мембран. В частности, было показано, что после пришивки дипептида EW к N-концу α -спирального полипептида (LSSLLSL)₃ удлиненный полипептид связывается с поверхностью клеточной мембраны, проникает в ее бислойную фосфолипидную структуру, образует в мембране ионные каналы и тем самым изменяет селективность ион-

ного транспорта (Lear et al., 1997). Это один из нескольких примеров того, что триптофановый остаток вблизи N-конца полипептидной цепи повышает селективность взаимодействия полипептида с внешней поверхностью клеточной мембраны.

Вилон

Дипептид вилон (L-Lys—L-Glu) был сконструирован на основании статистического анализа аминокислотного состава препарата Тималин (Морозов и др., 2000б; Хавинсон, 2001б). Данные табл. III Приложения свидетельствует о том, что этот дипептид представляет собой структурный элемент многих тимических гормонов. Как показывает рис. 3, отличительной особенностью этого дипептида является отчетливое разделение электростатических зарядов между двумя его концами: положительно заряженные аминокислотные группы принадлежат остатку лизина, а отрицательные заряды сосредоточены на остатке глутаминовой кислоты. Такая структура свидетельствует о способности вилон активно участвовать в электростатических (ион-ионных и ион-дипольных) взаимодействиях.

Изучение влияния тимогена и вилон на развитие органотипических культур тимуса и селезенки обнаружило их одинаковое стимулирующее действие на эксплантаты тимуса, но различное — на эксплантаты селезенки, полученные от животных разного возраста: тимоген стимулировал рост ткани как старых, так и молодых животных, а вилон — только старых (Хавинсон и др., 1999; Чалисова и др., 1999). Дальнейшие исследования показали, что вилон обладает выраженным стабилизирующим и регенерирующим воздействием на морфофункциональные характеристики органотипической культуры селезенки и оказывает стимулирующее влияние на стромальное микроокружение клеток в старых и переживающих культурах. В различных моделях преждевременного старения, вызванного гамма-облучением, обнаружено, что вилон модулирует иммунный гомеостаз животных, стимулирует репаративные процессы в вилочковой железе, повышает пролиферативную активность тимоцитов, таким образом ускоряя компенсацию микроциркуляторных расстройств в тимусе и селезенке (Хавинсон и др., 2001д; Князькин, Полякова, 2002; Князькин и др., 2002). Другими авторами было установлено, что вилон является наиболее

коротким регуляторным фрагментом, который способствует доставке трансфакторов в ядро или входит в структуру функционально активных центров трансфакторных комплексов, необходимых для активации транскрипции гена интерлейкина-2 в лимфоцитах (Хавинсон и др., 2000в). Дальнейшие исследования показали, что вилон способен усиливать активность нейтральной сфингомиелиназы, либо модулируя прохождение по сфингомиелиновому пути известных сигналов биологически активных веществ, в частности ИЛ-1 β , либо прямо передавая свою информацию в тимоциты через этот путь сигнальной трансдукции (Хавинсон и др., 2002б).

Исследование биологической активности вилона, проведенное на мышах линии СВА, обнаружило существенное увеличение максимальной продолжительности жизни этих животных в результате введения им препарата. При этом применение вилона оказывало угнетающее действие на развитие злокачественных опухолей и новообразований у самок мышей СВА (Хавинсон, Анисимов, 2000; Анисимов В. Н. и др., 2002а). Изучение влияния вилона на экспрессию генов показало, что гены, уровень экспрессии которых изменялся под действием пептида, относятся к самым разным клеточным системам. Однако наиболее широко среди них представлены гены клеточного деления и защитных систем клетки и организма. В частности, значимым можно считать изменение экспрессии генов, имеющих отношение к регуляции клеточного цикла и мембранного транспорта, а также генов, имеющих отношение к онкогенезу и обмену кальция (Анисимов С. В. и др., 2002).

Таким образом, регуляторное и иммуномодулирующее действие вилона на механизмы регенерации и канцерогенеза опосредовано стромальными клетками микроокружения (макрофаги, фибробласты, тучные клетки, эндотелиальные и ретикулярные клетки) и реализуется через микроциркуляторное русло. Данные, полученные при экспериментальных исследованиях биологического действия вилона, позволяют рекомендовать его дальнейшее изучение в качестве геропротекторного препарата. Применение вилона в гериатрии является целесообразным для коррекции возрастных нарушений ангио- и иммуногенеза, а также модулирования клеточной пролиферации и ингибирования канцерогенеза.

Значения суммарной гидрофобности боковых групп карнозина, вилона и тимогена, рассчитанные по данным

табл. 1 (1.5, 5.1 и 15.2 кДж/моль соответственно), показывают, что наименьшей гидрофобностью, т. е. наибольшей гидрофильностью, обладает молекула карнозина. По-видимому, его гидрофильность играет определенную роль в дестабилизации гидрофобных амилоидных β -структур (см. раздел 1.2.3)

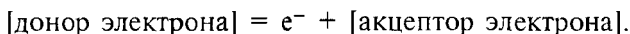
Чередования аминокислотных остатков с положительно и отрицательно заряженными боковыми группами характерны для большинства гидрофильных дипептидов, проявляющих биологическую активность. Например, Lys—Asp и Glu—Arg рассматриваются как простейшие регуляторы и стимуляторы физиологических функций (Белокрылов и др., 1998). При этом спектр функций, которые оказываются под влиянием рассматриваемых пептидов, очень широк и не обнаруживает тканеспецифичности. Можно предполагать, что эти молекулы не только сами проявляют регуляторную активность, но и могут быть агонистами других эндогенных регуляторов (в том числе непептидных), повышая чувствительность клеточных рецепторов к их действию.

Рассмотренные выше биологически активные дипептиды имеют сравнительно простую структуру и при этом способны участвовать в межмолекулярных взаимодействиях разного типа. Удлинение пептидной цепи повышает полифункциональность молекулы и увеличивает спектр ее регуляторных функций. В качестве примера можно привести синтетический тетрапептид Эпиталон (Анисимов и др., 2001).

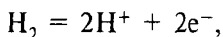
1.2.2. Окислительно-восстановительные свойства простых пептидов

Известно, что пептиды, боковые группы которых способны участвовать в окислительно-восстановительных реакциях, т. е. в процессах присоединения и передачи электрона, обладают высокой биологической активностью. Дыхательные цепи и реакции фосфорилирования в значительной степени определяются ходом окислительно-восстановительных реакций.

Окислители и восстановители всегда функционируют как сопряженные пары, аналогично кислотно-основным равновесиям (Ленинджер, 1974):



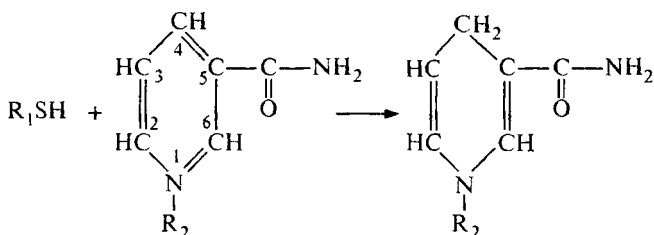
Равновесие этой реакции определяется величиной окислительно-восстановительного потенциала. В настоящее время в качестве стандартного принят потенциал реакции



который при pH 7.0 в водном растворе равен -0.42 V .

Измерение окислительно-восстановительного потенциала позволяет оценить изменение свободной энергии при переносе электрона. Например, перенос пары электрон-эквивалентов от молекулы НАД⁺ через всю дыхательную цепь к молекуле кислорода (потенциал $+0.82\text{ V}$) освобождает 22.1 кДж/моль химической энергии, которой достаточно для обеспечения синтеза нескольких молей АТФ из АДФ.

Боковые группы цистеина и гистидина проявляют слабые кислотные свойства: значения pK_a этих групп равны 8.3 и 6.0 соответственно, однако атом серы цистеина и атом азота в имидазольном кольце гистидина могут принимать и передавать электрон в зависимости от состояния окружающей среды. Окислительно-восстановительное состояние системы определяется как отношение концентраций окисленного и восстановленного компонента окс-редокс пары, например $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ или $\text{НАД}^+/\text{НАД} \cdot \text{H}$. На схеме представлена реакция восстановления никотинамидного кольца никотинамидаденилдинуклеотида (НАД⁺) под действием сульфгидрильной группы цистеина:



Результатом переноса гидрид-иона ($:\text{H}^-$) от атома серы является восстановление кольца в позициях 1 и 4.

Пептиды, содержащие остатки гистидина или цистеина, участвуют как коэнзимы или активные центры ферментных систем в каталитических реакциях и обеспечивают многие антиоксидантные системы организма. Находясь в составе мембранных пептидов, они отвечают за формирование электрического потенциала клетки и передачу электрохимического сигнала во внешнюю среду.

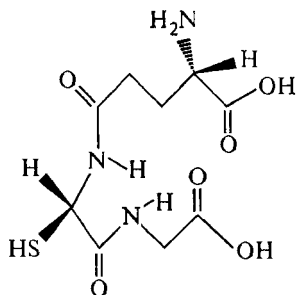
Многие пептидные регуляторы содержат в своем составе остатки цистеина. При окислении их сульфгидрильные груп-

пы образуют внутримолекулярные S—S-связи, которые формируют петли основной пептидной цепи (третичную структуру) и фиксируют определенную конфигурацию всей молекулы. Меркаптоэтанол и тиогликолевая кислота (восстановители) эти связи разрушают. Отсутствие антиоксидантов при выделении цистеинсодержащих пептидов из природных источников всегда приводит к получению молекул с более устойчивой третичной структурой.

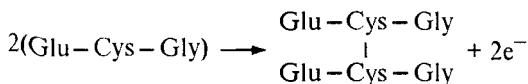
Глутатион

Известно, что свободный цистеин в нейтральной или слабощелочной области легко окисляется в присутствии кислорода или других окислителей и димеризуется, образуя цистин. Аналогичная реакция лежит в основе активности глутатиона.

Глутатион (γ-глутамил-цистеинил-глицин, или Glu—Cys—Gly) — широко распространенный трипептид, встречающийся практически во всех тканях живых организмов в концентрации 1—5 мМ, но в некоторых тканях она еще выше: в корковом слое хрусталика глаза млекопитающих концентрация глутатиона достигает 20 мМ. В клетках на его долю приходится до 90 % свободных тиоловых групп (Кричевская и др., 1983). Очевидно, что его пространственная структура с двумя сближенными карбоксильными группами обладает хорошими хелатообразующими свойствами и способна селективно связывать ионы переходных металлов и поливалентные катионы:



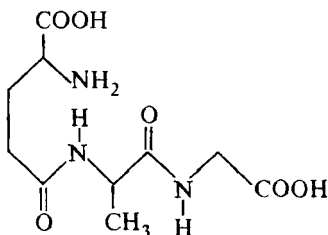
Окисление завершается обычно установлением дисульфидного мостика между двумя молекулами глутатиона:



Поэтому глутатион действует как антиоксидант, защищая сульфгидрильных групп ферментов и других белков. Он также играет особую роль в восстановлении окисленного аскорбата.

Еще одна функция глутатиона состоит в участии в транспорте аминокислот. Концентрация аминокислот в клетках поддерживается на сравнительно постоянном уровне и обеспечивается переносом их через клеточные мембраны с помощью специальных транспортных систем. Глутатион участвует в так называемом γ -глутамиловом цикле, т. е. в последовательности химических реакций, в которых γ -карбоксильная группа глутамата используется для активного транспорта аминокислот через клеточную мембрану. Глутатион предоставляет активированную γ -глутамиловую группу, связанную изопептидной связью, которая в результате транспептидазной реакции объединяется с транспортируемой аминокислотой. Полученная γ -глутамил аминокислота проникает в клетку, где дипептид расщепляется на свободную аминокислоту и 5-оксипролин. Последний преобразуется в глутамат в реакции с АТФ. Эта система транспорта специфична по отношению к нейтральным аминокислотам, глутамату и цистину (Кричевская и др., 1983).

На схеме представлен один из компонентов метаболизма глутатиона — офтальмовая кислота, аналог глутатиона, в котором тиоловая группа замещена метиловой:



Этот пептид впервые был выделен из хрусталика глаза, и его регуляторные функции еще недостаточно изучены.

Пептиды, содержащие гистидин

Другим примером олигопептидов, способных к изменению электронного состояния боковой группы, могут служить пептиды, содержащие в своей структуре гистидин. Мы уже упоминали, что гистидин практически не встречается в

Таблица 2

Влияние концентрации трипептида ГНК и его синтетических аналогов на синтез ДНК в клетках гепатомы* (определяли увеличение включения ^3H -тимидина, %) (по: Pickart, 1983)

Пептид	Концентрация, нг/мл			
	2	20	200	2000
Gly—His—Lys	50	408	339	91
Gly—His—Lys—His	82	604	387	84
His—Lys—Gly	31	368	353	56
Gly—Lys—His	2	36	65	31
His—Gly—Lys	2	13	81	29
His—Lys	0	8	30	26
Gly—His	0	0	6	3

* В случае других типов клеток в тканевой культуре концентрация, превышающая 1 мкг/мл, всегда угнетала рост клеток

тканях в свободном виде. Но он входит в состав многих ферментов и пептидов-регуляторов. Строение боковой группы гистидина обеспечивает широкий спектр активности его пептидам.

Из плазмы крови был выделен термостабильный трипептид Gly—His—Lys (ГНК), регулирующий скорость роста и дифференциацию клеток при их выращивании в тканевых культурах (табл. 2). Наибольшая концентрация этого пептида обнаружена в почках и мозге, а наименьшая — в коже и мышечной ткани. Интересно отметить, что аминокислотный состав ГНК идентичен, а последовательность остатков зеркальна по отношению к структуре бурсина (Lys—His—Gly—NH₂) — регуляторного пептида, который селективно определяет стадию дифференцировки В-лимфоцитов. Высокую биологическую активность трипептида ГНК обуславливают не только его хелатирующие свойства — в некоторых ферментах остаток гистидина фосфорилирован по 1-му или 3-му атому азота и служит донором в процессах фосфорилирования сахаров.

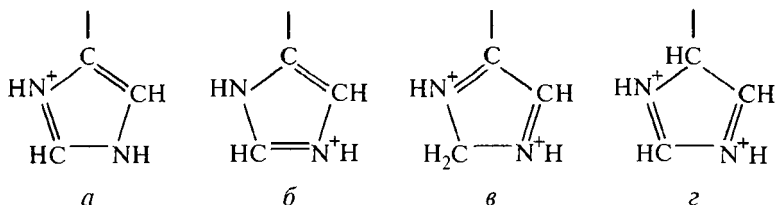
Одно из нетривиальных качеств этого трипептида — высокая селективность связывания ионов меди и других переходных металлов за счет их взаимодействия с имидазольным кольцом гистидина, благодаря чему пептид приобретает способность участвовать в окислительно-восстановительных реакциях.

Ниже приводятся константы стабильности k комплексов меди с сывороточным альбумином и пептидами (по: Pickart, 1983):

Хелатирующий агент	$\lg k$
Сывороточный альбумин	16.2
Gly—His—Lys	16.4
Gly—His	8.7
Gly—Gly—His	7.6
Gly—His—Lys + свободный His	29.0

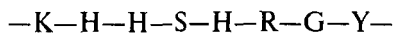
Представленные данные свидетельствуют о том, что комплекс меди с трипептидом GHK соизмерим по прочности с комплексом меди и сывороточного альбумина (СА). Но самый неожиданный результат этих измерений состоит в том, что добавление свободного гистидина почти в 2 раза увеличивает энергию связывания. Можно предполагать, что и для регуляторных пептидов, содержащих гистидин, свободный гистидин является в определенной степени агонистом.

Имидазольное кольцо гистидина имеет несколько резонансных форм:



Относительный вклад этих форм в общую энергию состояния кольца оценивается как 40% (*a*), 32% (*б*), 23% (*в*) и 5% (*г*) (Ching-Fa Wu et al., 1995). Резонанс электронных структур влияет на взаимодействие гистидила с соседними аминокислотными остатками, имеющими ароматические боковые группы, и определяет универсальность строения каталитических центров многих протеиназ, в частности так называемого блока «Charge-relay-system» (D—H—S), который мы рассмотрим в разделе 1.2.3. Теоретические расчеты максимальных и минимальных расстояний между π - и τ -атомами азота боковой группы и основной цепью полипептида показали, что близко расположенные вдоль цепи остатки гистидина склонны к ассоциации, т. е. к пространственному сближению, и таким образом стабилизируют активную конформацию пептида (Karlin et al., 1994). Приме-

ром высокой активности и тканеспецифичности действия пептидов, содержащих близко расположенные звенья гистидина, может служить щелочной пептид гистатин, выделенный из околоушной слюнной железы человека. В его структуре содержится шесть остатков гистидина из имеющихся в нем 22 аминокислот. Самый активный участок этого пептида состоит из восьми остатков, три из которых — остатки гистидина:



Этот пептид из семейства гистатинов индуцирует рост периодонтальных фибробластов при концентрации 0.1 мкг/мл и рекомендован для лечения парадонтозов (Takemura et al., 1994). По своим регуляторным характеристикам он может быть отнесен к классу цитомединов, а его специфическая биологическая активность определяется совокупностью всех физико-химических характеристик гистидиновых звеньев, которые были рассмотрены в этом разделе. Следует только подчеркнуть, что два гистидиновых остатка, расположенных рядом, значительно повышают селективность пептида в реакциях хелатирования полизарядных ионов металлов, что, по-видимому, важно как для нормальной регенерации периодонта, так и для осуществления других регуляторных функций.

1.2.3. Конформации пептидов в растворе

Образование полипептидной цепи — это частный случай полимеризации, в результате которой уменьшается суммарное число степеней свободы мономеров, а за счет этого макромолекула приобретает качественно новые внутримолекулярные степени свободы — конформационные, которые возникают вследствие поворотной изомерии полимерной цепи и отсутствуют у простых молекул.

По мере удлинения пептидной цепи порядок в системе возрастает аналогично тому, как горсть рассыпанных бус приобретает упорядоченность при нанизывании на нитку. При этом вероятность соприкосновения отдельных бусинок друг с другом увеличивается, если нитка будет скручена или свернется. В рамках этой аналогии объединение аминокислот в одну цепную молекулу позволяет их боковым группам сталкиваться и взаимодействовать друг с другом при изги-

бании и складывании пептидной цепи. Чем длиннее цепь, тем больше набор энергетически доступных конформаций.

Порядок расположения аминокислотных остатков относительно друг друга в молекуле пептида фиксирован, но именно вращение атомов и групп вокруг валентных связей, которое определяется набором возможных торсионных углов, обеспечивает существование множества конформаций пептида. Основная цепь пептида в растворе никогда не имеет простой формы вытянутой нитки. Наиболее вероятная конформация синтетического гомополимера — статистический (беспорядочно спутанный) клубок с максимальным значением конформационной энтропии. Природный пептид имеет более организованную конформацию — его цепь сложена в упорядоченные блоки из-за скручивания и уплотнения пептидной цепочки (Полинг, 1964). Методами рентгеноструктурного анализа было установлено, что полипептидная цепь, состоящая из L-изомеров, изогнута в виде спирали. Один шаг α -спирали вдоль оси пептида составляет 5.4 Å, и на каждый виток спирали приходится приблизительно 3.6 аминокислотных остатка. Каждый из остатков связан с остатками предыдущего и последующего витков водородными связями между атомом водорода амидной и атомом кислорода карбонильной групп.

На этом уровне молекулярной организации обнаруживается принципиально новое свойство пептидных молекул — способность выделить часть пространства как внутримолекулярную. Эта область внутри α -спиральной структуры недоступна для молекул воды и низкомолекулярных электролитов, тогда как остальная часть пространства, занятая растворителем, электролитами и другими пептидами, может быть названа внешней. Боковые группы аминокислот направлены в сторону внешнего пространства, гидратированы в соответствии со своими гидрофобными свойствами и расположены при максимально плотной упаковке в соответствии со своими удельными объемами (см. табл. 1). Обычные молекулярные модели недостаточно точно представляют конформации пептидных цепей, так как строятся без учета гидратации боковых групп аминокислотных остатков.

Известно, что способность к самоорганизации внутренних полостей проявляют водные растворы амфифильных молекул, например, таких как ионные поверхностно-активные вещества, в том числе фосфолипиды. При определенных концентрациях в водной среде они образуют мицеллы сферических или цилиндрических форм, которые сохраняют

внутреннее пространство, недоступное для «внешних» молекул. Но эти коллоидные частицы неустойчивы при изменении pH или ионной силы раствора, так как образующие их молекулы в отличие от звеньев полипептидной цепочки не соединены ковалентными связями. Кроме того, пептидные структуры имеют качественное топологическое отличие: они обладают хиральностью, т. е. они принципиально несовместимы со своим зеркальным отображением.

Не все аминокислотные остатки участвуют в образовании α -спирали: пролин и глицин являются звеньями, которые прерывают спиральную упорядоченность. Локальный разрыв внутримолекулярных водородных связей пептида под действием низкомолекулярных агентов (этанол, мочеви́на, гуанидин) также способствует разрыхлению спирали. Боковые группы аминокислотных остатков расположены в радиальных направлениях от спирали и поэтому не испытывают пространственных затруднений при вращении около $\text{CH}_2\text{—CH}_2$ -связей. Однако физико-химические свойства этих групп (гидрофобность, степень ионизации, окислительно-восстановительный потенциал) определяют характер их взаимодействий между собой. Эти взаимодействия типа притяжения и отталкивания могут быть весьма интенсивными, как стабилизируя спиральную конформацию основной цепи, так и способствуя ее разрушению.

Предпочтительная конформация макромолекулы определяется внутримолекулярными связями боковых групп. Именно эти связи обеспечивают конформационный порядок макромолекулы. Этот порядок уменьшает энтропию цепи, но его энергетическая устойчивость зависит от прочности внутримолекулярных связей боковых групп. Изменение этих связей ведет к конформационным изменениям в цепи. В живых системах все конформационные изменения пептидов обратимы, так как возможность конформационных переходов обеспечивается устойчивостью (прочностью) основной цепи пептида.

Остов полипептидной цепи представляет собой ряд жестких плоскостей с подвижным шарнирным сочленением в позиции асимметрических атомов углерода. При этом дипольные моменты пептидных связей располагаются коллинеарно в направлении от N- к C-концу, их векторы складываются, а структура основной цепи полипептида с гидрофобными боковыми группами становится регулярной. При изменении внешнего электрического поля такой полипептид меняет свою пространственную ориентацию в соот-

ветствии с величиной собственного дипольного момента, сохраняя конформацию цепи (Бирштейн, 1975). Обратимые изменения конформации основной цепи происходят, как правило, в полипептидах, имеющих боковые ионогенные группы, под влиянием изменения степени ионизации этих групп. В частности, возникновение α -спиральных структур в сополимерах глутаминовой кислоты и лизина зависит от рН внешнего раствора. Расчеты показали, что для этих синтетических сополимеров характерно весьма упорядоченное строение цепи с чередованием типа КЕКЕКЕКЕ или ККЕКЕКЕКЕКЕ (Волькенштейн, Фишман, 1967). Первый вариант структуры можно было бы назвать поливилонном.

Удлинение пептида с заряженными боковыми группами увеличивает диапазон его межмолекулярных взаимодействий за счет расширения диапазона ионизации его боковых групп. Это легко увидеть на примере снижения pK_a аминокислот лизина при переходе от димера к пентамеру (Stewart et al., 1962):

Пептид	pK_a
Лизин	8.95
Дилизин	7.56
Трилизин	7.26
Тетрализин	7.15
Пентализин	7.07

Аналогичная зависимость наблюдается и у полипептидов с карбоксильными боковыми группами. Иначе говоря, одинаково заряженные соседние ионогенные боковые группы полипептида, как и любого полиэлектролита, имеют повышенное среднее значение pK_a (т. е. пониженную среднюю кислотность) и расширенный диапазон степеней ионизации.

Учитывая тот факт, что изменение степени ионизации боковой группы полипептида всегда связано с изменением его локальной гидратации и конформации, можно ожидать, что такой полипептид способен выполнять одновременно и роль молекулярного рН-датчика об окружающей среде, и функцию исполнительного устройства, которое реагирует на изменение рН, изменяя свою гидратацию. Примером такого чувствительного рН-датчика и регулятора гидратации является композиционный сополимер гидрогеля и полипептида, влияющий на скорость поступления лекарственного вещества в клетку (Akala et al., 1998). Живые системы регулируют транспорт метаболитов с не меньшей эффективностью. Ниже (см. раздел 2.2) мы увидим, что мембранный белок, от-

вещающий за транспорт воды в клетку, работает по тому же принципу.

Существует огромный объем литературы, посвященной принципам структурной организации природных пептидов и белков. Эти работы выполняются методами конформационного анализа, при котором из всего набора доступных конформаций выделяется несколько наиболее доступных и энергетически выгодных. Подробный анализ таких работ представлен Е. М. Поповым (1997). Обобщая результаты литературных данных и собственных оригинальных работ, автор пришел к определенным выводам относительно закономерностей, в соответствии с которыми происходят конформационные изменения в полипептидных цепях. В физиологических условиях пространственное строение природного олигопептида описывается ограниченным набором низкоэнергетических компактных структур, стабильность которых обусловлена согласованностью всех внутримолекулярных невалентных взаимодействий. При изменении внешних условий (растворителя, температуры, кислотности, расстояния до соседней молекулы-рецептора) природный пептид адаптируется к ним смещением своего конформационного состояния. Смещение равновесия между предпочтительными структурами пептида происходит через последовательную смену конформаций с низкими энергиями в форме волны внутримолекулярного возбуждения. Иначе говоря, эта последовательность конформационных изменений также упорядочена, как и аминокислотная последовательность пептидной цепи. Новая конформация характеризуется новым спектром частот собственных колебаний и соответствующим изменением теплоемкости пептидной цепи (Попов, 1997).

Результаты теоретических расчетов для конкретных природных пептидов позволяют выделить в структуре каждого из них структурно жесткие участки, конформация которых меняется с большими энергетическими затратами, и структурно гибкие (лабильные) участки, которые обладают высокой торсионной подвижностью в области физиологических температур. В табл. 3 представлены структуры нескольких регуляторных пептидов, для которых рассчитана жесткость цепей (Попов, 1997). Отметим, что жесткие участки состоят из 4 или из 7 аминокислотных остатков, т. е. кратны числу остатков, приходящихся на один виток α -спирали. Расположение гидрофильных и гидрофобных остатков вдоль цепи также влияет на жесткость этих участков, так как α -спираль

Жесткость цепей регуляторных пептидов (по: Попов, 1997. С. 404)

Наименование	Аминокислотная последовательность*
Энкефалин	Y— <u>G—G—F</u> —L
Тимопентин	R— <u>K—D—V</u> —Y
Вазотоцин	C— <u>Y—I—Q—N</u> —C—P—R—E—NH ₂
Пептид дельта-сна	W— <u>A—G—G—D—A—S—G</u> —E
Ангиотен- зин II	D—R— <u>V—Y—I—H</u> —P—F
α-Меланотро- пин	S—Y—S— <u>M—E—H—F—R—W—G</u> —L—F—V
α-Эндорфин	Y—G—G—F—M— <u>T—S—E—K—S—Q—W—P—L—V—T</u>
Секретин	H—S—D—G—T— <u>F—T—S—E—L—S—R—L—R—E—</u> <u>G—A—R—L—Q—R—L—L—Q—G—L—V</u>

* Жесткие участки цепи подчеркнуты.

позволяет гидрофобным аминокислотным остаткам осуществлять внутримолекулярные связи. Все формулы пептидов, представленные в этой таблице и далее в тексте, соответствуют данным биохимического справочника (Oxford Dictionary..., 1997).

Рассматривая взаимосвязь структуры и биологических функций полипептидов, нельзя забывать, что всякая их функция основана на высокой подвижности компонентов живых клеток, а эта подвижность обеспечивается присутствием воды — одного из основных метаболитов. Несмотря на то что рибосомы и макромолекулы белков и нуклеиновых кислот очень плотно упакованы в цитоплазме между органеллами и эндоплазматическим ретикулумом (ЭР), благодаря присутствию воды они совершают конформационные переходы и разнообразные движения, для которых вода является не столько «окружением», сколько лабрикантом. Гидрофобное микроокружение (например, присутствие соседних гидрофобных поверхностей ЭР или липопротеиновых комплексов) также повышает молекулярную подвижность гидратированного полипептида.

Можно различить три вида внутриклеточных молекулярных движений: 1) вращения макромолекул; 2) перемещения из одной позиции в другую (трансляционные движения); 3) быстрые колебания (вибрации) атомов, составляющих молекулу. Все эти движения важны для того, чтобы моле-

кулярные поверхности пришли в контакт и могли осуществить определенное взаимодействие — выполнить специфическую функцию.

Скорости молекулярных движений исследуются с помощью различных методов спектроскопии. Этими методами установлено, что полипептидные макромолекулы в цитоплазме постоянно меняют конформации, изгибаются, вращаются и сталкиваются с соседями. Частота диффузионных столкновений полипептидов с низкомолекулярными компонентами пропорциональна концентрации диффундирующих молекул. Например, при обычной концентрации АТФ в клетке порядка 1 мМ каждая пептидная цепь подвергается случайным столкновениям с АТФ с частотой 10^6 в секунду (Alberts et al., 1994). Если иметь в виду, что эти молекулярные взаимодействия и химические реакции происходят в объеме $4 \cdot 10^3$ мкм³, т. е. в масштабах, очень далеких от условий лабораторной пробирки, то становится более понятной высокая эффективность ферментативных реакций *in vivo*. Результатом «удачного» столкновения с центром связывания может быть или образование межмолекулярного комплекса, или ферментный гидролиз. Это зависит от природы центра связывания.

Каталитический центр можно представить как некоторую фрактальную поверхность. Тогда скорость химической реакции (v) при диффузионном лимитировании представляется уравнением

$$v = k \cdot [A]^X,$$

где $[A]$ — концентрация взаимодействующих структур; k — константа скорости; X — показатель степени, указывающий концентрационный порядок реакции:

$$X = 1 + 2/D_s,$$

где D_s — фрактальная размерность каталитического центра (Kopelman, 1992).

В модельной системе молекулы $A = IJ$ случайно сталкиваются с центром связывания и немедленно превращаются в два молекулярных фрагмента I и J . Затем они могут двигаться по поверхности (или поверхность может двигаться под ними), в результате чего происходит рекомбинация фрагментов и возникает продукт II , который немедленно диссоциирует от каталитического центра. Самая большая

скорость такой реакции достигается, когда центром связывания является не поверхность, а одномерная цепь ($D_s = 1$, $X = 3$). В этом случае из-за уменьшения топологических ограничений она может создавать рекомбинации для осуществления реакций с тремя молекулярными столкновениями (Kopelman, 1992).

Эта умозрительная модель находит подтверждение при экспериментальном исследовании взаимосвязи конформации пептидной цепи с ее каталитической функцией. Установлено, что, если определенная конформация пептидной цепи сближает боковые группы с низкой реакционной способностью, эта их способность многократно усиливается именно за счет сближения. Такая конформация пептидной цепи, которая обеспечивает биохимически активное сближение боковых групп пептида, называется нативной.

Например, в пептидной цепи химотрипсина у гистидинового остатка His⁵⁷ атом азота N^ε пространственно сближен с карбоксильной группой остатка аспарагиновой кислоты Asp¹⁰², а атом азота N^π — с боковой группой серина Ser¹⁹⁵. Карбоксильная группа аспарагина принимает на себя протон от имидазольного кольца, в котором смещается электронная плотность, и атом азота N^π активирует гидроксильную группу серина, отнимая у нее протон, так что она образует ковалентную связь с карбонильной группой другого пептида (субстрата), разрывая тем самым его пептидную связь (Alberts et al., 1994). По этой схеме осуществляют гидролиз пептидной связи все сериновые протеиназы. Амфифильный характер пептидов и определенное чередование в их структуре гидрофильных и гидрофобных боковых групп приводят к дополнительным особенностям конформации пептидов в растворе. Они возникают в соответствии с правилом минимизации свободной энергии поверхности раздела пептида и водного окружения. Эта минимизация достигается пространственным разделением гидрофильных и гидрофобных боковых групп в форме β-листа или α-спирали (Kaiser, Kézdy, 1984). Схемы такой сегрегации представлены на рис. 4, А. Особенности α-спиральных структур с характерным расположением гидрофильных и гидрофобных групп на противоположных сторонах α-спирали были обнаружены еще в 1967 г. и с тех пор называются «колесами Эдмундсона», или спиральными колесами (Schiffer, Edmundson, 1967). В одиночной α-спирали боковые группы первой и четвертой аминокислот располагаются близко друг к другу на внешней цилиндрической поверхности молекулы. Это чередование

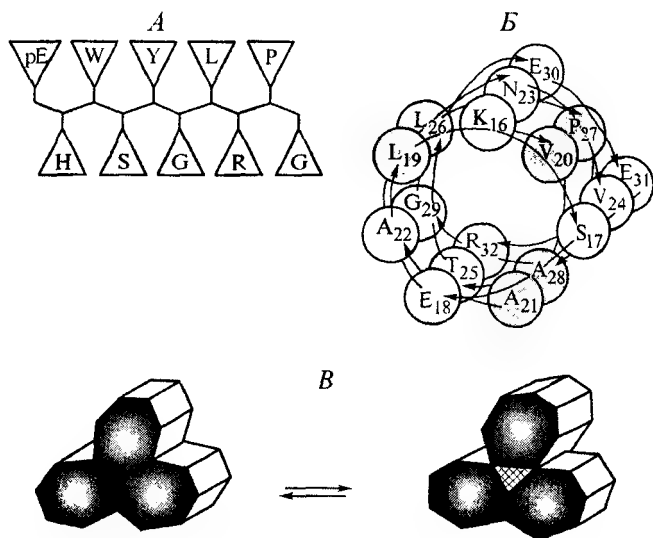


Рис. 4. Схемы β -листовой структуры гонадолиберина (А) и части скрученной α -спирали (суперспирали) тимопоэтина (Б), демонстрирующие пространственное разделение гидрофильных и гидрофобных (затемненные) аминокислотных остатков. Схема В представляет поперечное сечение жгута ассоциированных суперспиралей и конформационный переход, в результате которого образуется внутренний канал между суперспиралями.

повторяется с периодом 7 остатков, что соответствует двум оборотам α -спирали. Если в этих положениях находятся аминокислоты с гидрофобными боковыми группами, то образуется гидрофобное «ребро» α -спирали. Гидрофобные взаимодействия вдоль этого ребра дополнительно упрочняют систему водородных связей вдоль основной цепи пептида и общую структуру спирали. Кроме того, если гидрофобные боковые группы пептида попадают «в рифму» 1—4, то в силу особенности гидратации они имеют повышенные парциальные объемы, а гидрофобное ребро в этом случае приобретает более длинный период оборота по сравнению с обычной α -спиральной конформацией. На рис. 4, Б изображена в виде семигранного цилиндра скрученная спираль последовательности 16—32 иммуностимулятора тимопоэтина. Природный тимопоэтин — пептид из 49 аминокислотных остатков (см. табл. III Приложения), содержащий «активный центр» — пептидную последовательность 32—36. Химически синтезированный пентапептид идентичной структуры проявляет активность целой молекулы, за что и был назван тимопентином (табл. 3, строка 2). Предшествующий «актив-

ному центру» и следующий за ним участки цепи (16—32 и 37—49 соответственно) могут образовывать спиральные «колеса».

В составе представленного участка в позициях 19 и 26 находятся остатки лейцина. Нужно отметить, что лейцин играет особую роль в формировании и упрочнении спиральных структур. В структурных исследованиях сформировалось представление о «лейциновой застежке» (Leucine zipper — имеется в виду застежка-молния). Она представляет собой сравнительно короткие последовательности со средней длиной 24 аминокислотных остатка, среди которых в позициях 2, 5, 7, 12, 16, 21 и 24 находятся остатки лейцина, формирующие гидрофобные грани спирали. Такие структуры, характерные для трансмембранных участков мембранных белков, участвуют в межмолекулярных взаимодействиях белок—белок и белок—ДНК. В последнем случае конфигурация «лейциновой застежки» определяет контакт пептида с поверхностью двойной спирали ДНК (см. раздел 3.2).

Подобные α -спиральные блоки были обнаружены в цепях некоторых пептидных гормонов: кальцитонина, соматолиберина, кортиколиберина, аполипопротеина А, β -эндорфина (Kaiser, Kezdi, 1984). Этот принцип чередования аминокислотных остатков вдоль основной цепи был использован при конструировании и химическом синтезе аналогов природных гормонов (соматостатина и глюкагона) с повышенной специфической активностью (Rivier et al., 1978).

Особенностью скрученных α -спиральных участков (суперспиралей) является их способность укладываться несимметричными жгутами, как это показано на рис. 4, В. При этом гидрофобные ребра спиралей могут быть ориентированы внутрь жгута и плотно прилегать друг к другу — это одна конформация. При изменении взаимодействий на гидрофильных ребрах суперспирали гидрофобные ребра меняют ориентацию, а внутренняя часть жгута образует гидрофильный канал (Alberts et al., 1994). В следующей главе мы еще вернемся к пептидным суперспиралям при рассмотрении структур мембранных рецепторов.

Сегрегация гидрофильных и гидрофобных групп на разных гранях семигранной пептидной спирали сообщает молекуле дополнительные функциональные свойства (Zhou et al., 1992). Гидрофобные группы, расположенные на одном ребре семигранника, могут составить опознавательную детерминанту при взаимодействии с другими пептидами, имеющими гидрофобные участки (Immunostimulants, 1987). А

**Аминокислотные последовательности детерминантных участков
пептидных антигенов (по: Norpp, Woods, 1981)**

Белковый антиген	Детерминантный участок пептидной цепи
Гемагглютинин чумы	—E—R—R—E—G—D—
α-Цепь холеротоксина	—E—A—K—V—E—K—
Энтеротоксин <i>E. coli</i>	—E—R—M—K—D—T—
N-протеин стрептококков	—R—K—A—D—L—E—K—
Человеческий интерферон-I	—E—E—K—L—E—K—E—D—
Человеческий интерферон-II	—E—R—L—R—R—K—E—

гидрофильные, в частности ионогенные, боковые группы, расположенные последовательно по периметру сечения семигранника с определенным чередованием положительно и отрицательно заряженных групп, являются детерминантными участками связывания многих высокомолекулярных антигенов.

В табл. 4 представлены аминокислотные последовательности гидрофильных эпитопов нескольких антигенов (Norpp, Woods, 1981). Интересно отметить чередование положительно и отрицательно заряженных боковых групп вдоль этих цепей, что повышает энергетическую выгодность их расположения на общем ребре в свернутой спирали.

Обращает на себя внимание определенное качественное сходство детерминантных участков некоторых микробных антигенов с участками полипептидной цепи тимусных пептидов, отвечающих за иммунитет организма. По локальной плотности положительно и отрицательно заряженных боковых групп и по последовательности их чередования (повторение блоков KE и EK) эти пептиды очень похожи (см. табл. III Приложения).

Определенное сходство наблюдается между тимопентином и детерминантом гемагглютинаина чумы, а также между детерминантом холеротоксина и интерфероном. Можно предполагать, что в результате длительного эволюционного процесса возбудители особо опасных инфекций включили в состав своих антигенных детерминантов (эпитопов) пептидные участки, имитирующие аминокислотные последовательности пептидов иммунной системы человека.

Кроме процессов узнавания в системе «антиген—антитело» определенный порядок чередования положительно и отри-

цательно заряженных боковых групп очень важен для облегчения трансмембранного переноса полипептидной цепи. При статистическом анализе чередования Lys и Asp, Arg и Glu в структуре ряда секретируемых клеткой белков была обнаружена устойчивая тенденция этих остатков располагаться друг от друга на расстоянии четырех аминокислотных остатков (Heijne, 1980), что создает возможность локальной внутримолекулярной нейтрализации электростатических зарядов при свертывании пептида в амфифильную суперспираль.

Особое свойство амфифильной пептидной суперспирали как матрицы для нерибосомального пептидного синтеза было продемонстрировано в работе Ли с соавторами (Lee et al., 1996). Авторы экспериментально доказали, что скрученная пептидная цепь из 32 аминокислотных остатков с определенной последовательностью, образующая семигранник с двумя гидрофобными ребрами, обладает способностью к автокаталитической саморепликации, т. е. тем свойством макромолекулы, которое до последнего времени было обнаружено только у нуклеиновых кислот. В работе был использован метод автокаталитического синтеза пептидной связи на пептидной матрице. Образование пептидной связи между двумя олигопептидными фрагментами было организовано путем конденсации пептидных тиоэфиров (метод Кента) (Dawson et al., 1994). Реакционная смесь состояла из равных количеств электрофильных и нуклеофильных пептидных фрагментов в присутствии минорного количества целевого пептида — матрицы. Автокаталитический характер использованной реакции был подтвержден линейной зависимостью между начальной концентрацией матричных молекул и скоростью синтеза. Реакция оказалась весьма структурно- и хемоспецифической.

Известно, что реакции поликонденсации пептидных тиоэфиров протекают в клетках бактерий и низших эукариот при синтезе пептидов (в частности, пептидных антибиотиков) с участием специфических пептидных синтетаз. Подобный нерибосомальный синтез олигопептидов считается самым эволюционно древним способом пептидной самозащиты, поскольку такие пептиды содержат неcodируемые D-аминокислоты и проявляют повышенное сродство к фосфолипидным структурам клеточных мембран. Именно эти свойства позволяют им активно участвовать в нарушении мембранной проницаемости и проявлять антибиотический эффект по отношению к клеткам-конкурентам (Biotechnology of antibiotics, 1997).

В физиологических условиях конформации отдельных участков пептидной цепи могут меняться в результате подвижности боковых групп в пространстве при сохранении неизменного порядка вдоль цепи, однако эти изменения обратимы. Как показывают спектроскопические методы, каждая конформация имеет набор собственных характеристических колебаний. При возникновении нефизиологических условий конформация достаточно длинного полипептида может измениться до статистического клубка — без разрыва пептидных связей, но с потерей биологической активности. Этот конформационный переход называется денатурацией. При этом спектральные характеристики макромолекулы теряют определенность, а конформационная энтропия клубка достигает максимума.

В ряде случаев возвращение к физиологическим условиям позволяет полипептиду снова вернуться к нативной конформации, особенно если она стабилизирована внутрицепными S—S-связями. Однако такая ренатурация возможна только для одноцепочечных пептидов. Например, молекула инсулина, состоящая из двух пептидных цепей, связанных S—S-мостиками, после разрушения этих мостиков и денатурации не может вернуться к нативной конформации. Это определяется особенностями синтеза инсулина. Нативная конформация инсулина возникает в результате гидролиза проинсулина. Как показано на рис. 5, проинсулин синтезируется как одна пептидная цепь, содержащая на концах два участка: А- и В-цепи будущего инсулина с шестью свободными цистеиновыми группами в их составе. Средний участок проинсулина (С; см. рис. 5) принимает такую конформацию, при которой устанавливается определенная система S—S-связей между концевыми участками цепи. После выщепления среднего участка возникает активная двухцепочечная молекула инсулина. Именно по причине пространственной предопределенности этой структуры за счет среднего участка проинсулина спонтанная ренатурация инсулина невозможна. Иными словами, удаление части пептидной цепи равнозначно потере молекулярной информации для оставшихся частей инсулина.

В последнее время интенсивно проводятся исследования посттрансляционной модификации пептидов, в ходе которой с высокой селективностью осуществляется синтез пептидной связи, предопределенный конформацией соединяемых олигопептидов. Эта модификация включает два согласованных протеолитических расщепления пептида и последующее соединение концов двух полученных фрагментов. Примером

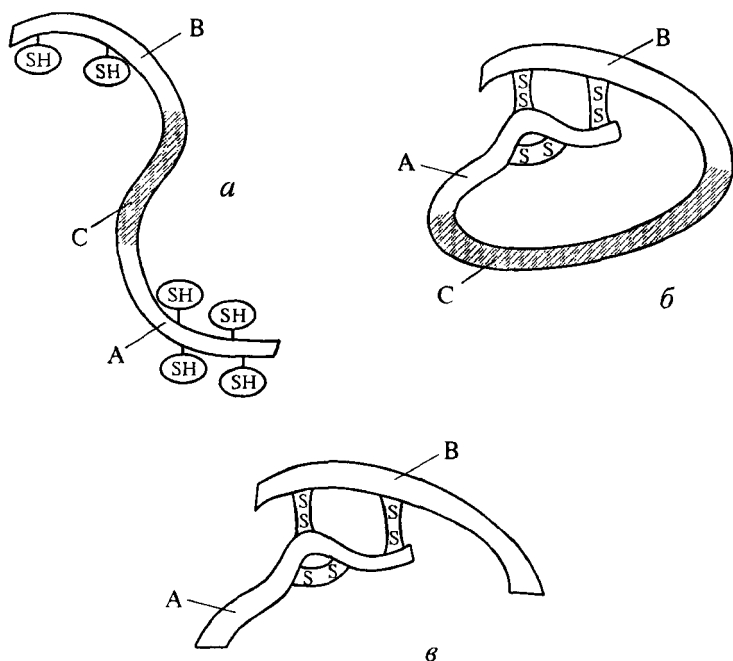


Рис. 5. Формирование молекулы инсулина из проинсулина.

a — строение пептидной цепи проинсулина: А и В — концевые участки, С — средний участок; *б* — конформационное изменение проинсулина, приводящее к внутримолекулярной S—S-сшивке его концевых участков; *в* — строение нативной молекулы инсулина.

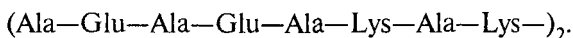
такой комбинаторики является соединение и циклизация двух усеченных цепей при биосинтезе макроциклического пептидного антибиотика θ -дефенсина, продуцируемого моноцитами и нейтрофилами (Tang et al., 1999). Такие процессы рассматриваются как пептидный сплайсинг (связывание концов), который происходит аналогично сплайсингу РНК (Cooper, Stevens, 1995).

Компактная конформация полипептида, закрепленная внутримолекулярными гидрофобными связями, определяет топографию расположения гидрофильных и гидрофобных боковых групп на поверхности макромолекулы, ее мозаичную структуру. Взаимное расположение заряженных боковых групп аминокислотных остатков на поверхности пептидной глобулы неоднородно: имеются области с разными по величине и знаку зарядами, что может быть отображено на карте электростатического потенциала поверхности.

Прямые вычисления этого потенциала по данным рентгеноструктурного анализа для ряда полипептидов и нуклеи-

новых кислот показали не только пространственную комплементарность, но и комплементарность электростатического потенциала поверхности (ЭПП) центров связывания ферментов с субстратами, антител с антигенами, ферментов с ингибиторами (Wainer et al., 1982). На примерах комплементарности ЭПП рибонуклеазы и РНК, трипсина и его ингибитора, тироксина и преальбумина показано, что участки этих молекул, не занятые в электростатическом притяжении лигандов и центров связывания, обеспечивают взаимное локальное отталкивание участников взаимодействия (в том числе и под действием электростатического отталкивания одноименных зарядов), так что энергетические барьеры для обратной реакции диссоциации комплекса не очень высоки. Иначе говоря, межмолекулярная комплементарность не смещает равновесие взаимодействия пептидов только в сторону связывания — соседние участки пептидной цепи обеспечивают обратимость этого процесса и диссоциацию комплекса. Такие подвижные равновесия лежат в основе межмолекулярной ассоциации биологически активных полипептидов как при энзиматическом катализе, так и при пептидной регуляции определенных функций клетки.

Электростатическая комплементарность взаимодействующих пептидов, не уравновешенная силами отталкивания, приводит к необратимым фазовым превращениям. Примером таких превращений служит спонтанная и необратимая самоассоциация пептидов, состоящих из чередующихся тетрапептидных блоков, комплементарных друг другу по знаку заряда:



В водных растворах эти пептиды образуют межмолекулярные ассоциаты со структурой β -листа и в присутствии солей выпадают в виде макроскопических мембран и волокон (Zhang et al., 1993). При комплексообразовании резко снижается гидратация пептидов. Электронная микроскопия позволяет увидеть их микроструктуру: переплетенные филаменты толщиной 10—20 нм. Они ни в чем не растворяются — ни в кислотах, ни в щелочах, ни при добавлении мочевины или гуанидина, ни под действием протеолитических ферментов. Есть все основания предполагать, что такого типа межмолекулярная ассоциация пептидов лежит в основе формирования амилоидозных отложений в различных тканях (Tomas et al., 1996). В частности, сывороточный бе-

лок — амилоид А с молекулярной массой 13.4 кДа продуцируется печенью под действием цитокинов и откладывается в виде самоассоциатов в различных органах и тканях, повреждая их и вызывая амилоидоз; β -амилоидный гликопротеин с молекулярной массой 86.8 кДа откладывается главным образом в нервной ткани и является одной из причин заболевания Альцгеймера. Аналогичные поражения мозга вызывают прионы — мембранные белки с молекулярной массой 33—35 кДа, которые, по-видимому, после потери гликофосфолипидной составляющей теряют нативную α -спиральную структуру и приобретают структуру β -листа. Во всех перечисленных примерах причиной амилоидозных отложений является необратимая, электростатически закрепленная самоассоциация комплементарных участков пептидных цепей, имеющих β -конфигурацию.

Значительные изменения конформаций полипептидов наблюдаются при энзиматической модификации их боковых групп: при метилировании, декарбоксилировании, деамидировании. Наибольшие изменения гидрофильности и конформации полипептидов происходят при фосфорилировании боковых групп серина, треонина или тирозина (под действием фосфокиназ) или при гликозилировании полипептида. Эти процессы относятся к другой области саморегуляции организма — к области согласованных ферментных систем, обеспечивающих метаболизм и взаимосвязь пептидов с другими классами молекул: с углеводами, полифосфатами и липидами.

Как уже упоминалось, все конформационные переходы и межмолекулярные взаимодействия в живых системах происходят в водном окружении, хотя эта вода организована в форму гидратационных оболочек (связанная вода) макромолекулы.

Очевидно, что изменение конформации пептида сопровождается изменением его гидратационных оболочек и системы водородных связей, которая в гидратационной воде имеет вполне определенную динамическую структуру. Боковые группы пептида расположены таким образом, что их водородные связи с другими группами легко меняют ориентацию и преобразуются в водородные связи с молекулами воды ближайшего окружения. Частота смены «партнеров по водородным связям» зависит от химической природы боковой группы и от ее расположения в данной конформации пептида.

Причиной изменения конформации пептидной цепи могут быть не только ее межмолекулярные взаимодействия, но

и изменения внутримолекулярных электростатических характеристик молекулы, связанные с изменением степени ионизации ее боковых групп. Ориентация вектора локального диполя (от центра тяжести отрицательного заряда к центру тяжести положительного) меняется по мере деионизации боковых групп (см. рис. 3) при изменении диэлектрической проницаемости или рН внешней среды. Результирующее изменение электростатической составляющей свободной энергии, как правило, приводит к изменению конформации всей молекулы. Поскольку каждая конформация представляет собой упорядоченную структуру, изменение конформации сопряжено с изменением порядка не только в структуре пептида, но и в координированной системе Н-связей водного окружения (см. рис. 4, *B* — переход α -спиральных конформаций в суперспираль). На фоне тепловых флуктуаций эти упорядоченные изменения воспринимаются объемной (свободной) водой не как возмущения, а как упорядоченные молекулярные сигналы об изменении конформации пептида. В этом качестве они могут транслироваться через водную среду к другим макромолекулам и клеточным рецепторам.

Предлагаемая упрощенная модель информационного дальнего действия подчеркивает только одну особенность молекулярных сигналов: их трансляция не связана с передачей массы или энергии. Она основана на чередовании обратимых конформационных переходов нативного пептида и связанной с ним воды. Для трансляции сигналов пептида о собственном конформационном состоянии не требуется специального кода, так как они исходно возникают в форме локального изменения и смещения системы водородных связей воды и в этой же форме транслируются и воспринимаются.

Решение конкретной задачи — какая форма сигнала характерна для данного пептида и какую реакцию этот сигнал может вызвать в пептиде-реципиенте — требует предварительного систематического сравнения аминокислотных последовательностей пептидов, выполняющих определенные регуляторные (информационные) функции. Как правило, их активность проявляется на уровне специализированных функциональных систем организма и часто определяется как тканеспецифическая. Этот вопрос мы рассмотрим детальнее в следующем разделе.

1.3. Тканеспецифические регуляторные пептиды

Эволюционный переход от одноклеточных организмов к многоклеточным системам и организмам сопровождался разработкой очень сложных механизмов межклеточной коммуникации для согласования поведения всех клеток в пользу общего организма. Возникла система сигнальных эндогенных молекул, главным образом производных аминокислот и пептидов, позволяющая клетке с помощью своей цитоплазматической мембраны и мембранных рецепторов отличать себе подобное клеточное окружение от чужеродного. Эта система межклеточных молекулярных сигналов дает возможность каждой клетке определить свою позицию и координировать с соседями моменты своего деления и апоптоза. Например, дрожжевая клетка существует как индивидуальный организм, но она влияет на пролиферацию сосуществующих с ней дрожжевых клеток. Когда в многоклеточном организме такой локальный «общественный» контроль за делением клеток не работает, начинается злокачественный рост отдельной ткани, губительный для всего организма.

У млекопитающих различают три вида информационной связи и координации функций органов и тканей: нейронную, эндокринную и паракринную.

Система нейронов контролирует и координирует функции всех органов и поведение организма в целом. Нейроны относятся к семейству электрически возбудимых клеток. Кроме нейронов к этому семейству относятся клетки мускулатуры и эндокринные клетки. При деполяризации клеточной мембраны нейроны генерируют потенциал действия, или нервный импульс, который распространяется по аксону от одного нейрона к другому со скоростью до 100 м/с. Длина аксонов разных нейронов различается, но самая большая может достигать 1 м (Alberts et al., 1994). Причиной деполяризации клеточной мембраны могут быть разные физико-химические факторы, в том числе нейротрансмиттеры пептидного типа.

Эндокринная сигнальная система состоит из специализированных клеток, которые выделяют в русло крови сигнальные молекулы (гормоны), в том числе регуляторные пептиды (РП). Распространяясь с кровотоком по всему организму, гормоны достигают целевых органов и клеток и захватываются их специфическими рецепторами. В среднем константы аффинного связывания гормонов рецепторами

превышают значение 10^8 л/моль, и поэтому гормоны действуют при концентрациях менее чем 10^{-8} М.

Сигналы паракринной системы регуляции осуществляются с помощью эндогенных молекул (локальных медиаторов), действие которых охватывает только клетки ближайшего окружения. К локальным медиаторам относятся регуляторные вещества разных классов: алармоны, эйкозаноиды и пептиды (Alberts et al., 1994).

Таким образом, каждая клетка многоклеточного организма находится под контролем со стороны координирующих информационных систем всего организма и со стороны ближайшего клеточного окружения. Она не только воспринимает предназначенные ей сигналы, но и может выделять собственные сигнальные молекулы, предназначенные своему окружению. Это аутокринная сигнальная система. Ее сигнальные молекулы не распространяются на дальние расстояния, а воспринимаются соседними клетками или задерживаются межклеточным матриксом (Alberts et al., 1994). Аутокринная система очень важна на этапе завершения развития организма, когда клетки сформированных органов переходят к стадии дифференциации. Когда группа идентичных соседствующих клеток начинает дифференцироваться, аутокринные сигнальные молекулы выделяются ими одновременно, что закрепляет переход клеток и всего органа к новой стадии функционирования (Пальцев, Иванов, 1995).

Многообразие аутокринных систем сигнализации различных органов обеспечивается тканеспецифическими семействами сравнительно коротких регуляторных пептидов. В большинстве случаев они синтезируются в клетке в виде относительно больших пептидов-предшественников, причем в состав предшественника, как правило, входит несколько участков, которые после высщепления приобретают способность регулировать определенные биологические функции. Эта эндогенная регуляция относится к одному из самых древних механизмов саморегуляции живых систем, хотя до настоящего времени она остается недостаточно изученной.

Также до сих пор нерешенной остается проблема взаимосвязи структуры РП и той функции клетки, которую он способен регулировать. Очевидно только одно — эта взаимосвязь очень специфична и исключает случайные вариации в структуре пептида.

Объединение аминокислот в пептидную цепочку на ранних этапах эволюции было, по мнению И. И. Шмальгаузена,

Таблица 5

Аминокислотный состав высокомолекулярных протеиноидов, полученных при 60 °С за 150 ч инкубации смесей аминокислот, содержащих избыток лизина или глутаминовой кислоты, % (по: Фокс, Дозе, 1975)

Аминокис- лота*	В системе с избытком Glu и Asp	В системе с избытком Lys
Gly	5.9	11.0
Ala	4.4	7.0
Hys	3.9	5.3
Pro	2.0	3.8
Asp	40.3	3.7
Glu	13.0	7.5
Arg	3.9	5.3
Lys	6.0	47.0

* Содержание остальных аминокислот не превышало 2 %.

чисто химическим стохастическим процессом (Шмальгаузен, 1961). В 50—60-х годах, до того как были разработаны методы направленного химического синтеза пептидов, синтетические полипептиды получали поликонденсацией аминокислот в присутствии фосфорной кислоты или полифосфата. Было показано, что полученные таким способом статистические полипептиды (протеиноиды) обнаруживают значительную селективность аминокислот при выборе соседа для образования пептидной связи. Протеиноиды, полученные из эквимольной смеси аминокислот, отличались от исходной смеси преобладанием глутаминовой кислоты, лизина и аланина (Фох, 1965). В том случае, если в исходную смесь включали избыток глутаминовой кислоты или лизина, аминокислотный состав продуктов различался и по содержанию гидрофобных аминокислот (табл. 5). Эти результаты свидетельствуют о различной реакционной способности аминокислот в реакциях статистической сополиконденсации. Позднее было показано, что в присутствии конденсирующих агентов свободные аминокислоты и адениловая кислота легко образуют аминокациладенилаты, а смесь аминокациладенилатов, в свою очередь, при pH 9.0 спонтанно образует протеиноиды с высокими молекулярными массами (Ленинджер, 1974).

Этот подход был положен в основу эмпирического синтеза статистических полипептидов, обладающих биологической активностью. Таким путем из смеси L-Ala, L-Glu, L-Lys и L-Tyr в соотношении 6.0 : 1.9 : 4.7 : 1.0 были получены полипептиды с неустановленной аминокислотной последовательностью (препарат СОР-1), которые обладают высокой эффективностью при лечении многих патологий мозга (Teitelbaum et al., 1971; Bornstein et al., 1987). Однако этот путь не позволяет установить взаимосвязь структуры РП с его специфическим действием.

При биологическом синтезе пептидов их аминокислотная последовательность детерминирована генетически. Эволюционный подход к функциям РП позволяет разделить их на три основные группы в соответствии с онтогенетическим происхождением из разных зародышевых слоев и с последующим разделением жизненно важных функций организма между различными органами и тканями. На ранних стадиях развития зародышей различают три слоя дифференцированных клеток: энтодерма — внутренний слой, мезодерма — промежуточный слой и эктодерма — наружный слой зародыша. Эта первая стадия дифференциации определяет дальнейшее развитие отдельных органов и тканей. Из эктодермы развиваются органы, с которыми связаны контактные, чувствительные и покровные функции: это эпителий, головной и спинной мозг, сенсорные органы (зрения, слуха, обоняния). Энтодерма является основой для развития пищеварительного тракта, органов дыхания, внутренних органов (сердце, эндокринные железы и половые органы). Промежуточный слой — мезодерма обеспечивает формирование органов с опорными и трофическими функциями: скелета, мышц, кровеносной системы, соединительной ткани. Структуры и тканеспецифичность известных регуляторных пептидов в определенной степени коррелируют с их родственным происхождением, а в ряде случаев структуры проявляют перекрестную тканеспецифичность. Схема объединения регуляторных пептидов в группы, соответствующие их происхождению, может быть использована для сопоставления их аминокислотных последовательностей со специфической активностью в организме.

Проведенный несколько ранее статистический анализ аминокислотных последовательностей эндогенных регуляторных олигопептидов, содержащихся в банке данных ЕРОР—Moscow в 1989 г., обнаружил в них повышенное содержание аминокислот с положительно заряженными и цикли-

ческими боковыми группами (Замятнин, 1990). В значительной мере это наблюдение связано с тем, что анализ касался в основном нейропептидов и нейрогормонов. За последнее десятилетие объем информации об аминокислотных последовательностях пептидов, относящихся к регуляторам функций иммунной системы и желудочно-кишечного тракта, существенно расширился. В этом разделе рассматриваются только пептиды умеренной длины как наиболее устойчивые (консервативные) структуры, сохранившие свои регуляторные функции в ходе филогенетического и онтогенетического развития. Их распределение по группам достаточно условно — они разделены в соответствии с преимущественной локализацией, функциями и онтогенезом. Необходимо также отметить, что эти пептиды, как правило, являются видонеспецифичными, т. е. встречаются и функционируют в большинстве высших организмов. В частности, убиквитин имеет одинаковое строение и выполняет свои разнообразные регуляторные функции у дрожжей, растений и у человека.

В настоящем разделе не рассматриваются регуляторные металлопептиды (например, кальмодулин, содержащий в структуре 4 атома кальция), которые не имеют определенной тканеспецифичности и являются по существу кофакторами многих ферментных систем (Oxford Dictionary..., 1997), а также гетерогенная группа интерлейкинов — видоспецифичных белков с молекулярными массами 12—21 кДа, которые действуют как сигнальные молекулы между различными популяциями лейкоцитов.

1.3.1. Нейропептиды

Нервная система позвоночных сочетает несколько функций: контроль за состоянием физиологических параметров внутри организма и за состоянием параметров внешней среды, передача полученной информации в центральную нервную систему, интегрирование информации и ее сравнение с данными, которые сохраняются в памяти, передача командных сигналов исполнительным органам всех систем организма и контроль за исполнением этих команд. Иными словами, нервная система имеет прямые регуляторные функции, которые определяются потоками информации о состоянии внешней и внутренней среды.

Нервная система человека состоит из нервных клеток — нейронов, соединенных между собой системой синапсов. В

головном мозге человека содержится приблизительно 10^{11} нейронов, и каждый из них в норме соединен посредством синапсов с сотнями и тысячами других. Помимо нейронов в мозге человека содержится соединительная ткань — клетки глии различных типов; причем их количество в 5—10 раз превышает количество нейронов: нейроглия составляет примерно 40 % объема головного и спинного мозга человека. Интегрирующая и командная информационные сети головного мозга снабжены несколькими эндокринными железами, которые синтезируют пептидные гормоны.

Классическая номенклатура эндокринных желез включает в себя гипофиз, эпифиз, гипоталамус, щитовидную и парашитовидную железы, поджелудочную железу, надпочечники и гонады (Панков, 1996). Исторически сложилось так, что регуляторы, выделенные из этих желез, были названы гормонами, среди них есть и высокомолекулярные белки, и небелковые соединения. Позднее обширную группу пептидов, выделенных из нейроэндокринных желез, стали называть нейропептидами (НП). В настоящее время это наиболее изученные регуляторные пептиды.

Предложенная И. П. Ашмариным (Ашмарин, Каменская, 1988) классификация пептидов включает в себя пептиды только нейронного происхождения. Придерживаясь этого правила и учитывая особенности тех тканей, из которых пептид выделен, в табл. I Приложения представлены наиболее простые регуляторные НП (Regulatory peptides, 1989; Ашмарин, Каразеева, 1999).

Многие НП и пептидные гормоны образуются из высокомолекулярных предшественников (например, протахокинина, проопиомеланокортина, хромогранинов и др.), синтез которых закодирован в соответствующих генах. В частности, хромогранин А, предшественник нескольких статинов, встречается во всех нейроэндокринных тканях и секретируется из панкреатических и тироидных С-клеток одновременно с другими гормонами. В его структуре содержатся блоки из двух аминокислотных остатков со щелочными боковыми группами (R—R, R—K, K—R и K—K), которые специфически гидролизуются внутриклеточными эндопептидазами. В результате образуются собственно регуляторные НП: парастатин, панкреастатин и вазостатин, которые ингибируют выделение катехоламинов, а вазостатин, кроме того, снижает сосудистое давление. Другие РП, получаемые в результате специфического гидролиза протахокинина и проопиомеланокортина, до особого сигнала сохраняются упакованными

в нейросекреторных гранулах в пресинаптических окончаниях нейронов. Процесс их выделения осуществляется, по-видимому, в форме обычного экзоцитоза после получения электросекреторного или химического сигнала с внешней стороны мембраны, в частности от мембранного рецептора.

Представленные в табл. I Приложения структуры НП различаются молекулярными размерами: число аминокислотных остатков в молекуле меняется от 3 (тиролиберин) до 44 (соматолиберин). В работе И. П. Ашмарина и М. А. Каменской (1988) представлены данные о продолжительности существования НП в плазме и спинномозговой жидкости, которые показывают, что малые пептиды из 3—8 аминокислотных остатков имеют время полураспада 1—2 мин, хотя тиролиберин в различных тканях остается активным до 1 ч. Более длинные пептиды сохраняют эффективность в течение нескольких часов.

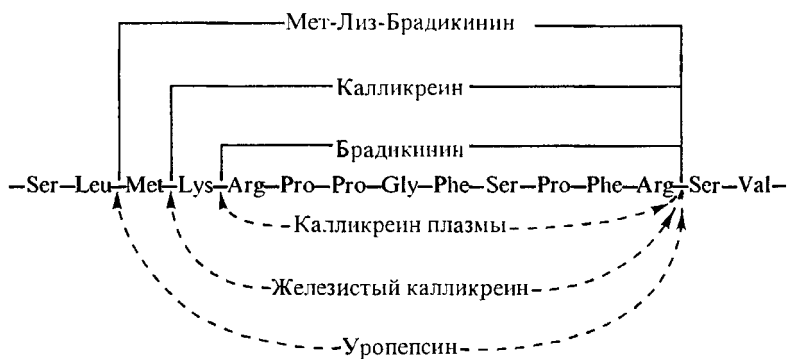
На устойчивость пептида в клеточной среде влияет в первую очередь природа первой, N-концевой, аминокислоты. Метионин, аланин, серин, треонин, валин, глицин, цистеин и пролин защищают пептиды от гидролиза. Остальные 12 аминокислот, оказавшись на N-конце, вызывают протеолитическую атаку (Alberts et al., 1994). Таким образом, НП проявляют более продолжительное действие по сравнению с обычными нейромедиаторами (ацетилхолином, гистамином, серотонином и ГАМК), которые активны в течение 10^{-2} —1 с. В ряде случаев пептиды, выделенные во внешнюю гуморальную среду (кровь, лимфу, тканевую жидкость), подвергаются гидролизу под действием пептидаз. Примером может служить каскадный гидролиз (рис. 6, А) предшественника брадикинина сериновыми протеиназами семейства калликреинов (Марголис, Бьюсе, 1983).

Сравнение структур эндорфина и энкефалинов позволяет предположить, что аналогичный поэтапный гидролиз осуществляется и в группе опиоидов.

Структурную взаимосвязь между различными НП, происходящими от одного предшественника, можно проследить на примере гормонов гипофиза. Часть из них содержит одинаковое гептапептидное ядро, которое обведено рамкой в аминокислотной последовательности α -меланотропина — меланоцитстимулирующего гормона (рис. 6, Б).

В кортикотропине (АКТГ) присутствует не только указанный гептапептид, но и целиком вся последовательность аминокислот α -меланотропина (сравним две последние

А



Б

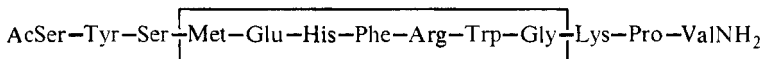


Рис. 6. Последовательный протеолиз участка цепи плазменного глобулина кининогена специфическими гидролазами (А) и аминокислотная последовательность α -меланотропина (Б).

строчки в табл. I Приложения). Такое же ядро обнаруживается в гипофизарных β - и γ -липотропинах (91 и 56 аминокислотных остатков соответственно), которые стимулируют реакции гидролиза липидов в жировых тканях. Эти гормоны, как и АКТГ, относятся к семейству гипофизарных гормонов, предшественником которых является проопиомеланокортин — прогормон из 241 аминокислотного остатка. Фактически липотропная активность собственно липотропинов не выше, чем у АКТГ и меланотропина, и до сих пор неясно, имеют ли они какую-либо собственную специфическую физиологическую активность, но оба липотропина присутствуют в плазме людей.

Данные о полифункциональности кортикотропина дополняются информацией о том, что пептидные участки его цепи 4—7 и 4—10 стимулируют внимание и обучение (Пономарева-Степная и др., 1984), а синтетический пептид Семакс, созданный на основе последовательности АКТГ (4—10) путем замены последних трех аминокислот для защиты от ферментного гидролиза, является стимулятором обучения пролонгированного действия и рекомендован для клинического применения (Гомазков, 1997):

С одной стороны, наличие общего гептапептидного ядра в структуре гипофизарных гормонов указывает на эволюционную взаимосвязь гормонов этой группы. С другой стороны, структурная организация этих гормонов и последовательное изменение функций по мере гидролитического отщепления определенного числа аминокислотных остатков позволяют увидеть, как экономно построены эти пептидные регуляторы. В том же кортикотропине часть аминокислотной цепи (остатки 7—38) способна ингибировать синтез кортикостероидов — один из главных процессов, для стимуляции которого предназначена целая молекула кортикотропина. Этот пептид также был выделен из гипофиза и назван кортикотропин-ингибирующим пептидом:

SYSMEN—FRWGKPVGKKRRPVKVYPNGAGAEDESAEAFPLEF

Кортикотропин и его ингибитор CIP

Аналогичная зависимость наблюдается в структуре β-эндорфина. Часть пептидной цепи (остатки 6—31) была синтезирована и проявила ингибирующее действие на анальгезию, вызываемую β-эндорфином (Choh Hao Li, 1984). Соответственно этот пептид был назван β-эндорфин-ингибирующим пептидом, ниже на схеме показано его строение:

YGGFM—TSEKSQTPLVTLFKNAIKNAYKKGE

β-эндорфин и его ингибитор EIP

Однако не всегда фрагменты НП, оставшиеся после гидролиза целой молекулы, ингибируют действие исходного пептида. Фрагмент галанина 1—15 оказывает потенцирующее влияние на активность исходного пептида, за счет того что повышает чувствительность селективных к нему рецепторов в гиппокампе.

Общность принципов построения пептидных регуляторов наблюдается не только при буквальной гомологичности структур, но и при сходстве «структурных мотивов». Это особенно важно при анализе регулирующих функций пептидов различных групп, например нейропептидов и гормонов пищеварительного тракта. Ниже представлено сравне-

ние структур меланостатина (MS) — нейропептида, содержащегося в мозге, надпочечниках и сердце, кишечного пептида, ингибирующего экзокринную секрецию поджелудочной железы (YY) и панкреатического пептида (PP), регулирующего пищеварение и стимулирующего функции поджелудочной железы (Oxford Dictionary..., 1967):

MS: YPSKPDNPGEDAPAEDMARYYSALRHYINLITRQRY—NH₂

YY: YPIKPEAPGEDASPEELNRYYYASLRHYLNLVTRQRY—NH₂

PP: APLFPVYPGDNATPEQMAQYAADLRRYINMLTRPPY—NH₂

Очевидно, что представленные структуры гомологичны друг другу, но проявляют при этом различные активности. Не только удаление части полипептидной цепи, но и замена одного аминокислотного остатка другим в пределах определенной аминокислотной последовательности может привести к изменению смысла сигнала на противоположный: в частности, ингибирующий сигнал YY становится стимулирующим при замене нескольких аминокислот. В то же время некоторое удлинение пептида на С-конце позволяет существенно пролонгировать его действие при сохранении специфической активности, что было показано на примере АКГГ_{4–10} и тафцина (Пономарева-Степная и др., 1984; Потаман и др., 1992). Создается впечатление, что N-конец НП более семантически значим, чем участки его С-конца.

1.3.2. Пептиды желудочно-кишечного тракта

Органы желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и его эпителий развивались главным образом из энтодермы. Как известно, в пищеварительном тракте осуществляется наиболее тесный контакт внутренней среды организма с «внешней средой», представленной набором пищевых продуктов, в которых питательные компоненты и электролиты варьируют в широких пределах. Так как концентрации питательных веществ во внутренней среде организма должны поддерживаться в относительно малом интервале значений, сохранение питательного гомеостаза обеспечивается в первую очередь ограничением скорости переваривания и всасывания питательных веществ через кишечный барьер. Поэтому важнейшее значение для питательного гомеостаза имеет согласованность скоростей выделения пищеварительных ферментов, скорости изменения локальных кислотно-щелочных

показателей и скорости перистальтического движения перевариваемых продуктов в каждом отделе ЖКТ (Гальперин, Лазарев, 1986).

Семейство пептидных гормонов, которые специфически контролируют и регулируют функции ЖКТ, представлено в табл. II Приложения. Структуры пептидов ЖКТ (ЖКП) также обнаруживают значительное количество гомологичных участков аминокислотной последовательности, что свидетельствует об общем эволюционном пути формирования этих гормонов (Климов, 1983). В среднем эти пептиды имеют бóльшую длину по сравнению с нейропептидами, видовые вариации строения отдельных участков цепи также значительно выше. По-видимому, это обеспечивает как более длительную активность ЖКП, так и лучшую их защищенность от действия протеиназ ЖКТ.

Сравнение представленных в табл. II Приложения структур пептидов пищеварения — ЖКП позволяет увидеть некоторые общие для них признаки: сходные N-концевые последовательности, амидированные C-концевые остатки и наличие сдвоенных аминокислотных остатков. Укороченные пептиды амидированных концов гастрин и холецистокинина сохраняют активность целых молекул гормонов. Однако самым интересным свойством ЖКП является их вездесущность — они обнаружены не только в органах пищеварения, но и в плазме крови и структурах головного мозга. Гастрин, холецистокинин и полипептид VIP (вазоактивный кишечный пептид) впервые обнаружены в ЖКТ, впоследствии они были найдены в головном мозге и клетках блуждающих нервов. В то же время некоторые гормоны и медиаторы головного мозга (субстанция Р, нейротензин, энкефалин, соматостатин и др.) вырабатываются эндокринными или нервными клетками, которые находятся как в головном мозге, так и в эпителии ЖКТ (Климов, Барашкова, 1993), в частности в клетках APUD-системы (Райхлин и др., 1993). Это свидетельствует о том, что организм не признает жестких рамок классификации для биологически активных веществ и использует последние там, где они нужны.

Такая картина единого поля взаимосвязанных механизмов пептидной регуляции явилась основой для создания новой концепции о существовании в организме функционально непрерывной совокупности регуляторных пептидов — континуума регуляторных пептидов, способного обеспечить стимуляцию или подавление любых проявлений жизнедеятельности.

тельности и, более того, любых оттенков жизнедеятельности (Ашмарин, Обухова, 1986). Эта концепция состоит не только из представления о том, что все жизненные функции обеспечиваются непрерывным контролем со стороны регуляторных пептидов, каждый из которых обладает комплексом активностей, проявляющихся лишь в определенном диапазоне концентраций и имеющих ограниченную продолжительность проявления. Она включает также представление об иерархии функций пептидов, при которой один регуляторный пептид индуцирует выход другого, а тот в свою очередь — следующего и т. д. Частным случаем этой системы взаимной индукции является действие либеринов и статинов гипоталамуса на выход гормонов гипофиза (Ашмарин, Каразеева, 1999). Таким образом, возникает каскад регуляторных процессов, который, однако, находится под постоянным контролем центральной нервной системы, ориентированной на анализ изменений внутренней и внешней среды организма.

Нейропептидный контроль охватывает не только функции ЖКТ, но и регуляцию защитных иммунных систем организма. В последние годы убедительно доказано влияние НП на функциональную активность клеток иммунной системы (Корнева и др., 1999), хотя в определенной степени эта система сохраняет автономность.

1.3.3. Пептиды иммунной системы

Регуляция защитных функций организма связана главным образом с активностью тимической системы. Из тимуса млекопитающих выделено несколько пептидных регуляторов, отвечающих за функционирование Т- и В-лимфоцитов (Hannappel et al., 1982b). В табл. III Приложения представлены структуры некоторых наиболее изученных пептидов-иммуностимуляторов. При этом аминокислотные последовательности пептидов, обладающих различной специфичностью (тимопозтин контролирует развитие и функционирование Т-лимфоцитов, а тимозин α_1 — созревание и функционирование В-лимфоцитов), содержат гомологичные участки КЕК и элементы двоек аминокислотных остатков глутаминовой кислоты (Мартынов и др., 1986). Иммуностимулирующей активностью обладают не только молекулы тимопозтина, тимозина и тимулина, но и их фрагменты (Вегнер и др., 1984). Тимозин β_4 , обладающий

высокой активностью в реакции ингибирования миграции макрофагов, обнаруживает несколько повторных «димерных» элементов: ЕК, ЕТ и РD. По-видимому, пептиды иммунной системы (ИП), как и нейропептиды (НП), сохраняют биологическую активность фрагментов после протеолитического гидролиза первичной молекулы. Например, тимозин β_4 содержит участки цепи, также выделенные из тимуса, названные тимозин β_8 и тимозин β_9 и сохраняющие активность молекулы β_4 . Гомологичные участки этих трех пептидов содержат аминокислотные остатки с заряженными боковыми группами, тогда как переменные участки включают остатки серина и аминокислот с гидрофобными боковыми группами (Hannappel et al., 1982a).

Высокую точность настройки аминокислотной последовательности на выполняемую функцию иллюстрирует сравнение специфического действия тимопоэтина и спленина с активностью их синтетических аналогов — пентапептидов RKDVY и RKEVY соответственно. Тимопоэтин и его пентапептид-аналог селективно индуцируют только Т-лимфоциты, тогда как спленин и его низкомолекулярный аналог индуцируют и Т-, и В-лимфоциты (Audhya et al., 1984). По-видимому, решающую роль в этой селективности играет разница в длине боковых ионогенных групп аспарагиновой и глутаминовой кислот, расположенных рядом с аминокислотной группой лизинового остатка, что определяет возможность установления внутримолекулярной солевой связи и разницу в величине локальных дипольных моментов этих пентапептидов.

В табл. III Приложения не включены данные о структуре интерферонов — гликопептидов с молекулярной массой 15—30 кДа, которые образуются в активированных вирусом клетках. Интерфероны не предотвращают проникновение вируса в клетку, но ингибируют синтез белка, без которого не проходит трансляция вирусной мРНК (Reem et al., 1982). Не рассматриваются также ВИЧ-сопряженные пептиды, хотя некоторые из них, вероятно, проявляют регулируемую функцию в иммунной защите организма при ВИЧ-инфекции (Гомазков, 1995). В табл. III Приложения представлена только структура олигопептида, ингибирующего протеиназу ВИЧ-1 и тем самым — репликацию этого вируса (Louis et al., 1998).

К этой же группе пептидов, осуществляющих защитные функции, относится убиквитин, впервые выделенный из тимуса телят и идентифицированный как пептид, обеспечивающий дифференциацию Т- и В-тимоцитов предположи-

тельно путем связывания с β -адренергическими рецепторами этих клеток и последующей активации аденилатциклазы (Goldstein et al., 1975). Позднее была установлена аминокислотная последовательность убиквитина (последняя строка табл. III Приложения), и в ней обнаружены участок, гомологичный N-концевому тетрапептиду тимического гуморального фактора γ_2 (аминокислотные остатки 50—53), а также повторяющиеся пары КЕ и ЕК, общие для последовательностей тимозинов α_1 и β_4 (Schlesinger et al., 1975). С помощью специфических антител к убиквитину методом радиоиммунного анализа этот пептид был обнаружен практически во всех тканях позвоночных (больше всего его в тимусе, мозговых тканях и почках), а также в дрожжах и высших растениях. Универсальность этого пептида сочетается с его высокой полифункциональностью. Одна из его функций состоит в обеспечении быстрой деструкции белковых макромолекул. Конденсация убиквитина с экзогенным белком в цитоплазме приводит к раздвоению (бифуркации) пептидной цепи и быстрому протеолизу такого белка на протеосомах. Таким образом, в клетке существуют два механизма деградации белков: 1) убиквитинизация с последующим протеолизом на протеосомах и 2) протеолиз в лизосомах. Однако первый из этих механизмов действует значительно быстрее. По-видимому, цитолитическая эффективность Т-киллеров в значительной степени связана с активностью убиквитина (Wilkinson, Audhya, 1981).

Способность убиквитина присоединяться к ϵ -аминогруппам лизина полипептидов определяет его регуляторные свойства, которые он проявляет не только в цитоплазме, но и в клеточной мембране (De Bold et al., 1981). Позднее было показано, что убиквитин выполняет также определенные функции в хроматине — он участвует в регуляции процессов репликации и транскрипции в клеточном ядре. Кроме того, деградация циклинов — белков, отвечающих за регуляцию цикла клеточного деления, также обеспечивается убиквитинизацией.

1.3.4. Атриопептиды

Натрийуретические пептиды были впервые описаны Де Болдом в начале 80-х годов (De Bold et al., 1981). Позднее выяснилось, что эти пептиды регулируют экскрецию солей из организма. Было показано, что атриопептиды (АП) вы-

деляются из предсердий в условиях, когда миоциты стенки предсердия испытывают напряжение (растяжение). Регулируя диурез и сосудистый тонус, сердце способно освобождаться от избыточного объема циркулирующей жидкости и регулировать артериальное давление (Алексеев, Орехович, 1987). Таким образом поддерживается кардиоваскулярный гомеостаз.

Гистологические исследования показали, что кардиоциты предсердий существенно отличаются от кардиоцитов желудочков тем, что содержат специфические гранулы, связанные с аппаратом Гольджи, что характерно для типичных эндокринных секреторных клеток. Это свидетельствует об уникальности кардиоцитов предсердий: они совмещают две физиологические функции — функцию мышечного сокращения и функцию эндокринной клетки. Выполняя эндокринную функцию, клетка обеспечивает себе выгодный режим мышечной работы (Gunning, Brenner, 1992).

АП происходят из общего предшественника; биологической активностью обладают пептиды с молекулярной массой от 3 до 44 кДа. Высокомолекулярные формы под действием протеолитических ферментов переходят в более активные низкомолекулярные формы. Наибольшей активностью обладают пептиды из 25—33 аминокислотных остатков.

Основное действие АП направлено на почки, где они снижают давление в капиллярах и увеличивают потоки ренальной плазмы. Действие АП начинается быстро, в течение 1—2 мин достигает максимума и завершается через 20—30 мин.

Независимо от размера молекулы АП млекопитающих имеют общую характерную особенность: внутримолекулярная дисульфидная связь образует 17-членную кольцевую структуру. В табл. IV Приложения представлены аминокислотные последовательности АП, а на рис. 7 — первичные и вторичные структуры АП в двух разных конформациях: циклической и димерной. Димерная форма обладает пролонгированным действием по сравнению с циклическими формами. Для проявления биологической активности необходимо наличие свободных N- и C-концов, тогда как атриопептин-кольцо активностью не обладает. В то же время высокоактивный антипараллельный димер АП имеет не только упрочненную за счет цистиновых мостиков конформацию, но и по паре свободных N- и C-концов.

Кроме миокарда предсердий АП были обнаружены в гипоталамусе и нейронах мозга — натрийуретический пептид

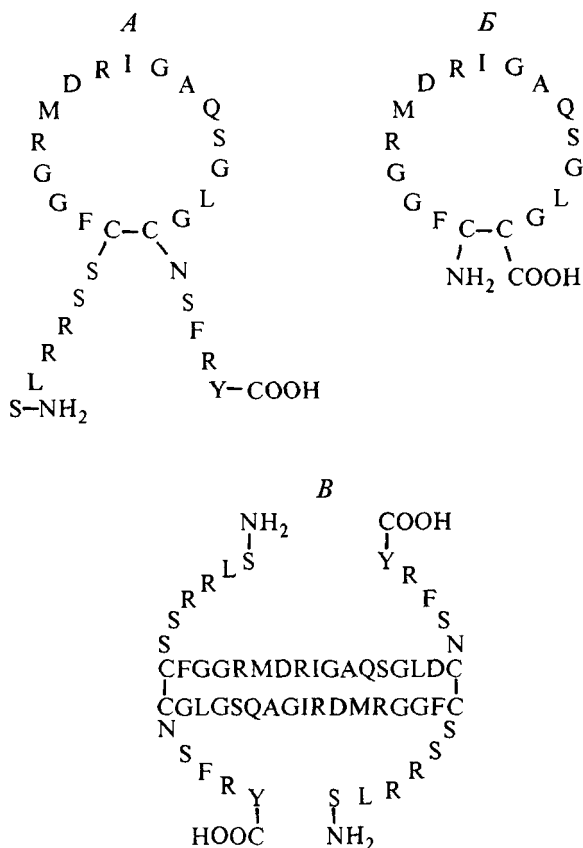


Рис. 7. Аминокислотные последовательности и конфигурации атриопептидов человека.

A — α -натрийуретический пептид; *Б* — атриопептин-кольцо; *В* — β -натрийуретический пептид — антипараллельный димер.

мозга и натрийуретический пептид типа С (две последние строки в табл. IV Приложения), а также в глазных камерах крыс (Stone, Glembotski, 1986). Более того, высокоспецифические рецепторы к АП обнаружены не только в клетках почечных канальцев, надпочечников, гладких мышц аорты и эндотелия сосудов, но и в клетках головного мозга. Несмотря на некоторую разницу в аминокислотном составе кольца, эти АП взаимодействуют также с антителами к кардионатрину (Gunning, Brenner, 1992).

Таким образом, в этой группе пептидов наблюдается та же закономерность, что и в других группах — пептиды, секретируемые клетками соматических тканей, обнаруживают-

ся в соответствующих нейронах мозга, т. е. еще раз подтверждается наблюдение, что саморегуляция организма обеспечивается тканеспецифическими пептидами, но при этом контролируется центральной нервной системой.

1.4. Регуляторные пептиды как носители молекулярной информации

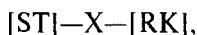
Исследования соответствия между аминокислотной последовательностью и функцией полипептидной цепи интенсивно развивались в 90-х годах, когда объединенная международная база данных обеспечила условия для системного анализа связей «структура—функция». Краткий обзор состояния дел в этой области представляется целесообразным ввиду очень большого объема литературы и многообразия эмпирических подходов на резко различающихся теоретических уровнях.

Существуют два подхода к рассмотрению структуры пептидных цепей: структурный анализ и анализ аминокислотной последовательности.

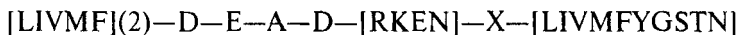
Структурный анализ является методом исследования общей «архитектуры» полипептидных макромолекул. С его помощью в макромолекуле можно выделить структурные домены — единичные элементы компактно упакованных участков цепи, связанные с прилегающими более рыхлыми и гибкими участками цепи. Структурные модули могут рассматриваться как подкласс доменов. Примером может служить структура ядерных белков высокой подвижности. Структурным анализом выделены такие элементы упаковки полипептидной цепи, как β -бочонки (β -barrels), трансмембранные петли рецепторов, экстра- и интрацеллюлярные модули.

Анализ аминокислотных последовательностей имеет целью рационализацию огромного объема уже имеющихся данных о первичной структуре полипептидов. Основным методом этого анализа — установление элементов сходства в структурах разных белков. Сопоставление консервативных участков цепи с функциональными характеристиками молекулы позволяет объединить многие белки в одну группу. Например, рецепторы, связанные с G-белками (мускариновые, опиоидные, адренорецепторы и др.), образуют семейство с определенными сигнальными и фармакологическими свойствами.

Сравнение многочисленных структур белков, выделенных из разных источников, позволило обнаружить общие признаки у белков, выполняющих одинаковые или близкие функции — в их структурах сохраняются консервативные участки полипептидной цепи. Эти островки постоянства в море мутационных вариаций чаще всего называют мотивами, иногда блоками или сегментами. В настоящее время анализ аминокислотной последовательности применяется для классификации и оценки принадлежности белка к тому или иному семейству (Pietrokovski et al., 1996). На протяжении всей макромолекулярной цепи, как правило, находятся не один, а несколько мотивов, характерных именно для определенного семейства белков. Обычно эти участки состоят из 10—15 аминокислотных остатков, но встречаются и более короткие. Например, центр фосфорилирования протеинкиназ С имеет последовательность (Bairoch et al., 1996):



где X — любая аминокислота. Структурное сходство ряда белков, участвующих в АТФ-зависимых процессах раскручивания нуклеиновых кислот, определяется несколькими общими мотивами, один из которых, так называемый DEAD-box, характерен для большинства АТФ-связывающих белков (Pietrokovski et al., 1996):



Статистический подход позволяет рассчитать относительную частоту появления каждого аминокислотного остатка в цепи и повторных появлений одних и тех же сочетаний аминокислотных остатков. Таким методом в некоторых белках выявляются многократно повторяющиеся регулярные последовательности. Так, например, в тропоколлагене каждый третий остаток — глицил, после которого следуют пролил или оксипролил. В α -цепи фибриногена 31 % всех аминокислот — это серин, глицин и пролин в составе одних и тех же повторяющихся сочетаний. Регулярные последовательности, включающие глицин и пролин, характерны и для других белков, таких как склеропротеины, кератины, двухцепочечный фиброин шелка. С одной стороны, эти последовательности оптимальны для образования правой α -спиральной конформации цепи и упорядоченного расположения гидрофильных и гидрофобных участков на «гранях» этой спирали (см. рис. 4, раздел 1.2.3). С другой стороны,

преобладание в регулярных последовательностях остатков глицина и пролина, необходимых для изгиба пептидной цепи, облегчает переход макромолекул в суперспиральную конформацию, при которой три или семь α -спиральных участков скручиваются вместе, образуя структуру, напоминающую трехжильный или семижильный кабель (Ленинджер, 1974). Все эти белки выполняют структурные (опорные) функции, а регулярные блоки в их структуре стабилизируют определенные механические свойства макромолекулы или допускают их изменения. Иными словами, взаимосвязь «структура—механическая прочность» для этих белков достаточно очевидна. Целесообразно расширить исследование (поиск) соответствий между аминокислотной последовательностью пептидной цепи и ее физиологическими функциями, которые отличаются от механических. Этой задаче посвящен статистический анализ аминокислотных последовательностей 242 регуляторных белков, относящихся к семейству факторов транскрипции (Atchley et al., 2000). В результате было обнаружено, что определенные структурные характеристики полипептидов — расстановка аминокислотных остатков, их ассоциация вдоль цепи и тавтология некоторых пептидных блоков — связаны с выполнением этими белками регуляторной функции, т. е. с инициированием транскрипции генов. Эта функция обеспечивается консервативными участками полипептидной цепи с морфологией «спираль—петля—спираль», которые специфически связываются с промотерными сайтами ДНК. Была предложена схема информационной связи между двумя спиральными участками белка (Atchley et al., 2000). Подробнее этот механизм межмолекулярного взаимодействия пептид—ДНК будет рассмотрен в главе 3.

Ниже проводится сравнение частотных характеристик и аминокислотных последовательностей регуляторных пептидов и более высокомолекулярных регуляторных полипептидов (белков).

1.4.1. Частотные характеристики аминокислотных последовательностей РН

Как показывают данные табл. I—IV Приложения, регуляторные пептиды (РП) различных групп обладают некоторыми общими свойствами. С одной стороны, все они имеют сравнительно малый размер (молекулярная масса этих пеп-

тидов не превышает 10 кДа) и проявляют физиологическую активность в ультрамалых дозах. Во многих случаях фрагменты РП проявляют биологическую активность, модулируя активность предшественника: изменяя диапазон активности или ингибируя ее. По-видимому, функциональная и тканевая специфичность действия этих пептидов связана с разнообразием клеточных рецепторов, хотя возможность безрецепторного проникновения в клетку и прямого воздействия пептида на внутриклеточные процессы в настоящее время уже нельзя полностью исключать из рассмотрения.

С другой стороны, данные табл. I—IV Приложения демонстрируют разницу в аминокислотном составе пептидов, принадлежащих разным тканям и участвующих в регуляции тканеспецифических функций. Аминокислотный состав каждой группы РП можно использовать для сравнения их между собой по частоте включения аминокислотных остатков, подобно тому как это сделано для «усредненного белка» в работе В. А. Конышева (1985). Для такого сравнения и использованы данные, приведенные в вышеупомянутых таблицах, и полученные результаты даны в табл. 6, где представлены только 9 первых разрядов, так как в исследуемых системах аминокислотные остатки, относящиеся к первым 6 рангам, занимают более 55 %, а остатки первых 9 рангов — более 80 % всех мест в полипептидных цепях. В табл. 6 также включены данные для нескольких регуляторных белков, которые будут рассмотрены в следующем разделе. Хочется отметить, что распределение аминокислот по рангам частоты для природных регуляторных пептидов и белков отличается от такового синтетических протеиноидов (см. табл. 5) высоким рангом лейцина, глутаминовой кислоты и цистеина, но сходно с ним высоким рангом глицина, аланина и лизина.

Частотная характеристика аминокислотного состава пептидов каждой группы является очевидной причиной частоты повторов одних и тех же сочетаний аминокислотных остатков в их цепях. Менее очевидна причина того, что аминокислотные остатки, включенные в пептидную цепь, следуют друг за другом с определенным предпочтением (селективностью). По-видимому, как показывает статистическая поликонденсация аминокислот (Фох, 1965; Фокс, Дозе, 1975), это связано с различием их реакционной способности. Поскольку в процессе эволюции определенные селективные сочетания аминокислотных остатков оказались полезными для жизненно важных функций организма, они были за-

Ранговый порядок аминокислотных остатков в составе РП и регуляторных белков, принадлежащих разным регуляторным системам

Группа РП	Ранг аминокислотных остатков								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Нейропептиды	L	G	A	R ⁺	P	S	E ⁻	Y	T
Пептиды ЖКТ	L	G	D ⁻	A	F	S	T	E ⁻	K ⁺
Иммунопептиды	E ⁻	K ⁺	L	D ⁻	S	T	A	G	V
Атриопептиды	G	S	R ⁺	L	C	K ⁺	F	M	D ⁻
Аквалпорин 0	L	A	G	V	F	S	R ⁺	T	P
Тромбоцитарный фактор роста	L	A	G	V	R ⁺	P	E	Q	S
Глиальный нейротрофический фактор	L	A	R ⁺	D ⁻	S	K ⁺	G	V	P
Белок Р-57	A	E ⁻	K ⁺	P	T	G	D ⁻	S	Q
Фактор роста эндотелия сосудов	E ⁻	C	R ⁺	K ⁺	P	Q	F	D ⁻	S
Тропонин Т	E ⁻	K ⁺	R ⁺	A	L	D ⁻	Q	G	I
Вырожденность генетического кода*	L ^{x6}	R ^{x6}	S ^{x6}	G ^{x4}	A ^{x4}	P ^{x4}	V ^{x4}	T ^{x4}	I ^{x3}

Примечание. Аминокислотные остатки, имеющие ионогенные боковые группы, отмечены соответственно плюсом или минусом.

* В индексе — кратность вырожденности (Ленинджер, 1974).

креплены на уровне генома. Однако сравнение вырожденности генетического кода каждой аминокислоты (числа кодонов, которые обеспечивают встраивание ее в пептидную цепь при рибосомальном синтезе) с частотой ее включения в пептиды обнаруживает некоторую корреляцию только для группы нейропептидов. Существенных корреляций для других групп пептидов и высокомолекулярных регуляторных белков обнаружить не удалось.

Рассмотрим повторы одних и тех же сочетаний аминокислот (регулярных последовательностей) в каждой группе РП.

По данным табл. I—III Приложения проведен статистический анализ частот одних и тех же повторов коротких аминокислотных последовательностей (димеров, тримеров, квартетов и квинтетов) в составе пептидов, принадлежащих разным функциональным группам. Прочтение аминокислотных последовательностей проводилось от N- к С-концу.

Из расчета исключены табличные последовательности коротких олигопептидов, входящих в состав уже учтенных более длинных полипептидов данной группы. В табл. 7 представлены повторяющиеся фрагменты аминокислотных последовательностей пептидов каждой группы.

Среди более высоких ассоциаций можно отметить блоки (квартеты и секстеты), где одна из аминокислот заменена на близкую по физико-химическим свойствам: это YLDS и YLES, а также TSDFSK и TSDYSK в составе пептидов ЖКТ.

Подобный статистический анализ расположения соседних аминокислотных остатков в полипептидной цепи проводился и раньше (Панков и др., 1976; Erhan et al., 1980; Пансевич, Барковский, 1990). В частности, один и тот же пентапептид был обнаружен в структуре гистонов и β -галактозидазы (Erhan et al., 1980). В составе кальмодулина Л. И. Пансевичем и Е. В. Барковским (1990) были выявлены двукратные повторы тримеров и квартетов: EAF, AEL, AVD, DKDG, DGDG, DGNG, IREA. Конформационный анализ, выполненный этими авторами, показал, что обнаруженные повторяющиеся блоки находятся преимущественно в α -спиральных или β -листных конформациях. Полученные данные о сходстве повторяющихся блоков и их конформаций было предложено использовать как для классификации организмов, принадлежащих к разным таксономическим группам (Erhan et al., 1980; Пансевич, Барковский, 1990), так и для поиска корреляций между последовательностью аминокислот в тримерах и матрицей нуклеотидного кода (Панков и др., 1976).

С нашей точки зрения, многократное повторение индивидуальных звеньев в группе пептидов может служить признаком функциональной общности этой группы и основой для тканеспецифической классификации полипептида. По этому признаку кальмодулин не относится ни к одной из исследованных нами групп пептидов-регуляторов.

Приведенные в табл. 7 результаты демонстрируют несколько интересных особенностей в аминокислотных последовательностях РП.

Во-первых, для каждой группы тканеспецифических регуляторов характерны разные составы и последовательности аминокислот в повторяющихся блоках, за исключением блоков EA и ED, повторяющихся по 3 и 4 раза в составах нейро- (НП) и иммунопептидов (ИП).

Во-вторых, простая комбинаторика показывает, что из 20 кодируемых аминокислот можно получить 400 димеров,

**Повторяемость аминокислотных блоков в составе регуляторных пептидов,
относящихся к разным физиологическим системам**

Число повто- ров	Нейропептиды, <i>n</i> = 284 а. о.	Желудочно-кишечные пептиды, <i>n</i> = 278 а. о.	Иммунопептиды, <i>n</i> = 219 а. о.
Димеры			
6	Не обнаружено	SD	KE
5	GE, GL, IL, VG	DF, FT	EK, LE
4	AR, AS, ED, EH, IL, KP, LS, LR, PG, RP, RY	EE, KK, QL, QG, RL	LK, SD, TL
3	AE, DA, EA, EQ, LT, NL, SA, SY, YI, YP	AD, AQ, DY, EL, FV, GP, GT, HS, KY, LE, LL, LR, MD, PS, SI, SK, TF, TS	EA, ED, KS
2	54 димера	37 димеров	28 димеров
Тримеры			
3	Не обнаружено	FTS	LED
2	EDA, GED, LRH, PGE, QRY, RQR, RHY, RYY, TRQ	DEV, DPS, DYS, GTF, GWM, ISD, KKY, KYL, MDF, QGP, QDF, QMA, RLR, SDY, SEL, TFT, TSD, VFT, WMD	KEK, KKK, QEK
Квартеты			
2	GEDA, LRHY, PGED, RGRY, TRQR	FTSD, GWMD, QDFV, SDYS, TFTS, WMDF	LEDG
Квинтеты			
2	PGEDA, TRQRY	GMMDF	Не обнаружено

различающихся составом и последовательностью остатков. Хотя далеко не все они присутствуют в составе исследуемых пептидов, но более трети присутствующих повторяются дважды или чаще (30, 37 и 47 % димерных повторов в составе ИП, НП и пептидов ЖКТ соответственно). Следует подчеркнуть, что каждый димер индивидуален: у него есть структурные «голова» и «хвост» в сочетании с вектором соб-

ственного дипольного момента, расположением электрических зарядов и молекулярной подвижностью.

В-третьих, как сами РП, выделенные из различных тканей, так и повторяющиеся блоки в их составе сочетают в своих структурах гидрофильные и гидрофобные аминокислотные остатки, т. е. характеризуются амфифильностью, хотя усредненная гидрофобность НП выше, чем гидрофобность ИП.

Мы провели разделение пептидных регуляторов на группы в соответствии с существованием в организме нескольких многофункциональных систем управления (нервной, иммунной, пищеварительной), каждая из которых состоит из многих органов со специализированными функциями. Поэтому пептиды в каждой группе сильно варьируют по диапазону регуляторных функций. Например, для НП характерна «триада» основных действий (Ашмарин, Каразеева, 1999): 1) сокращение или расслабление гладкой мускулатуры; 2) вазомоторная активность; 3) рилизинг-функции.

Для пептидов, регулирующих систему пищеварения, характерны 1) периодическая стимуляция энзиматических процессов в различных отделах ЖКТ; 2) поэтапная регуляция перистальтики системы; 3) последовательное и координированное ингибирование гидролитических ферментов в разных отделах ЖКТ (Климов, 1983; Гальперин, Лазарев, 1986).

Органопрепараты медико-биологического назначения в известной мере дублируют эти тканеспецифические функции. В частности, препараты класса цитомединов (Морозов, Хавинсон, 1983) и цитаминов (Морозов и др., 2000а), выделенные из определенных органов и тканей, обладают специфичностью регуляции, соответствующей функциям этих органов и тканей, хотя спектр регулируемых ими функций обычно уже, чем у эндогенной системы РП. Каждый из этих препаратов восстанавливает нарушенную саморегуляцию определенного органа: мозга, коронарных сосудов, поджелудочной железы, печени, простаты или тимуса. При этом структуры отдельных пептидов, выделенных из этих препаратов с помощью ионообменной хроматографии, обнаруживают композиционную принадлежность к той или иной группе РП. В частности, в состав препарата Тималин входят РП, которые относятся к группе иммунопептидов, так как они содержат блоки КЕ и КАК (Морозов и др., 1977).

По-видимому, аналогичный частотный анализ повторяющихся олигопептидных блоков может быть применен к

другим семействам высокомолекулярных полипептидных регуляторов, таких как факторы роста, трансформации, нейротрофические факторы и мембранные рецепторы, для которых характерна не столько тканевая, сколько функциональная специфичность. Выделение характерных олигопептидных блоков таких групп необходимо не только для направленного встречного синтеза пептидных лечебных препаратов, имитирующих функции природных макромолекул. Общие блоки в структуре регуляторных полипептидов — свидетельство их принадлежности к определенным семействам — могут служить базой для построения физико-химических моделей межмолекулярных взаимодействий полипептидов с живой клеткой; такие взаимодействия являются, по-существу, информационными.

1.4.2. Информационная нагрузка аминокислотных последовательностей РП

При рассмотрении механизмов саморегуляции организма особый интерес представляют сигнальные функции его компонентов. Как писал И. И. Шмальгаузен, «связи между организмом и средой не ограничиваются явлениями обмена веществ и энергий. Большое значение имеет восприятие сигналов, которые не имеют непосредственного значения в обмене веществ, но определяют поведение организма» (Шмальгаузен, 1968. С. 268).

Первичный уровень связи живой системы с внешней средой основан на изменениях тех параметров внешней среды, которые можно назвать энергетическими: температуры, давления, кислотности среды, потока трофических веществ. Восприятие этих изменений обусловлено чувствительностью соответствующих клеточных рецепторов: изменением их конформации, гидратации, степени диссоциации ионогенных групп, а также смещением равновесий метаболических реакций в клетке. Это первичный, или энергетический, уровень взаимодействия живой системы с внешней средой.

Вторичный уровень связи организма со средой ориентирован на изменения порядка во внешней среде: это восприятие энергетически постоянных параметров внешней среды при изменении их ориентации (направления), длительности или последовательности. Мы замечаем не только высоту и интенсивность звуков (энергетический уровень),

но и изменение их ритма (вырожденность) или изменение чередования одних и тех же звуков. Такое восприятие (его называют информационным) не является энергетическим — это восприятие изменения энтропии во внешней среде на фоне постоянного энергетического взаимодействия со средой. По мере усложнения живой системы и ее связей с внешним окружением метаболические потоки дополняются информационными.

Особенность жизни как термодинамического феномена заключается в том, что открытая живая система воспринимает изменение порядка в окружающей среде (т. е. поток информации) и соответственно меняет свои внутренние параметры (программу поведения) для самосохранения. Иначе говоря, живой системе присущи не только метаболизм и самовоспроизведение, но и восприятие потока информации, необходимой для саморегуляции.

Формы упорядоченности окружающей среды разнообразны. В силу определенных причин и законов неживой природы из бесконечного числа одновременно сосуществующих частиц, колебаний и волн формируется узкая полоса частот с повышенной интенсивностью. Например, на фоне рваных серо-синих туч и голубого неба возникает семицветная радуга (иногда две) со строгой последовательностью интервалов длин волн электромагнитных колебаний. Для визуального восприятия радуги требуется только одно — чтобы у реципиента было цветовое зрение. Аналогичный принцип лежит в основе формирования музыкальных звуков в природе. Эолова арфа, например, выделяет в сплошном шуме ветра одну резонансную частоту звуковых колебаний, усиливает их, и человек слышит определенную музыкальную ноту. Это примеры восприятия упорядоченности на фоне «шума» распространяющихся звуковых или электромагнитных волн. Энергетическая составляющая этих колебаний важна только для преодоления порога чувствительности воспринимающего органа.

На уровне энергетических взаимодействий регуляторные функции, строго говоря, свойственны всем веществам, участвующим в метаболизме клетки. Концентрации ионов водорода и аммония, ионов металлов, а также аминокислот и их производных обеспечивают потенцирование или ингибирование биохимических реакций как участники или продукты этих реакций (Кричевская и др., 1983). Можно сказать, что биохимическая регуляция лежит в диапазоне концентраций компонентов 10^{-2} — 10^{-7} М.

На молекулярном уровне соотношение энергетической и информационной составляющих взаимодействия зависит от уровня организации системы. По-видимому, среди компонентов живых систем самый высокий уровень молекулярной организации достигнут у полипептидов, что позволяет им выступать в роли индукторов и реципиентов молекулярной информации. Отдельные фрагменты полипептидов (регуляторные пептиды) могут служить носителями молекулярной информации.

Биологическая активность регуляторных пептидов рассматривается обычно с двух точек зрения: с точки зрения фармакокинетики, изучающей продолжительность их действия в организме, и с точки зрения фармакологии, изучающей взаимосвязь дозы вещества (обычно отнесенной к единице массы тела подопытного животного) с наблюдаемым эффектом. При этом используется шкала молярных концентраций, позволяющая сравнивать действие пептидов, имеющих разную молекулярную массу. Диапазон активных концентраций может служить критерием трофических или информационных функций пептида.

Одна из особенностей пептидной регуляции состоит в том, что она наблюдается при очень низких концентрациях (порядка 10^{-18} — 10^{-12} М), при которых непосредственное участие пептидов в реакциях биосинтеза не может быть существенным (Ашмарин, Каменская, 1988; Ашмарин и др., 1992; Сазанов, Зайцев, 1992). С этой точки зрения эффективная доза пептида Lys—Pro, равная 10^{-4} моль на 1 мышь и влияющая на регенерацию тканей (Kohl et al., 1989), является скорее трофической, чем сигнальной. В то же время синтетические пептиды, влияющие на экспрессию рецепторов тимоцитов в концентрациях порядка 10^{-13} — 10^{-14} М, можно считать сигнальными (Хавинсон, Жуков, 1992).

Цитологические эксперименты и клинические наблюдения свидетельствуют о том, что препараты класса цитомединов также содержат именно информационные тканеспецифические олигопептиды, поскольку в диапазоне их эффективных концентраций (10^{-10} — 10^{-12} М) они, по-видимому, не имеют трофического значения (Морозов, Хавинсон, 1983; Хавинсон, Жуков, 1992; Кузник и др., 1999).

Химические сигналы, передаваемые аминокислотами или простыми нейромедиаторами, независимо от концентрации имеют очень краткую длительность. Напрашивается аналогия с более высоко организованными системами коммуникации: нейромедиаторы, подобно устной речи, являются

моментальными сигналами, так как они «звучат» очень недолго. По мере удлинения пептидной цепочки увеличиваются устойчивость и время жизни сигнала. Информация, записанная последовательностью аминокислотных остатков, подобно письменному сообщению, сохраняется дольше во времени и может диффундировать на более удаленные расстояния в пространстве (Ашмарин, Каразеева, 1999).

Как правило, аминокислотную последовательность пептида, для которого уже установлена определенная регулирующая или модулирующая функция, можно обнаружить в составе одного или нескольких значительно более крупных белков. Этот установленный факт имеет несколько интерпретаций. С одной стороны, существует теория И. П. Ашмарина о непрерывном функциональном спектре РП, которые происходят из общих предшественников (например, проопиомеланокортин и препротахикинин) путем их поэтапного расщепления на более мелкие фрагменты. Сам по себе предшественник никакой специальной активности не проявляет, но его фрагменты выполняют различные регуляторные функции, в том числе нейромедиаторные и нейрогормональные (Ашмарин, Обухова, 1986; Ашмарин, Каменская, 1988).

С другой стороны, известна гипотеза В. Т. Иванова о существовании специфического пептидного пула (фонда), который происходит из функционально активных высокомолекулярных белков путем тканеспецифического ферментного гидролиза этих белков до пептидов определенного размера (Иванов и др., 1997). В частности, исследование продуктов гидролиза гемоглобина и пептидов, содержащихся в питательной среде при культивировании человеческих эритроцитов, показало, что определенные отрезки цепей α - и β -глобинов проявляют биологическую активность, не свойственную исходному гемоглобину: они связываются с опиатными рецепторами, ингибируют глюкозо-6-фосфат-изомеразу, ингибируют ангиотензин-преобразующие ферменты, потенцируют действие брадикинина. Некоторые из этих пептидов, названные геморфинами, были обнаружены в мозжечке, гипофизе и спинномозговой жидкости человека, в мозгу быка и гипоталамусе свиньи. Авторы этих исследований указали на сходство геморфинов с пептидами класса цитомединов. Эта точка зрения нашла подтверждение в работах Р. В. Петрова, посвященных выделению регуляторных пептидов из супернатанта культуры клеток костного мозга — миелопептидов. Два пептида — МП-1 и МП-2 оказа-

лись идентичны консервативным фрагментам α - и β -цепей гемоглобина (Петров и др., 2000).

Обе упомянутые концепции опираются на представление о специфическом и определенным образом запрограммированном расщеплении высокомолекулярных белков-предшественников на короткие пептиды, выполняющие сигнальные функции в поддержании тканевого гомеостаза (Янковский, Довнар, 1986).

Аналогичные представления лежат в основе поиска РП среди фрагментов пищевых белков, но при этом характер воздействия пептида на функции клетки остается неопределенным (Yamamoto, 1997).

Однако эти гипотезы о происхождении регуляторных олигопептидов не определяют механизмов регуляторного воздействия олигопептида на функции клетки. Хотя есть примеры и обратной связи низкомолекулярных и высокомолекулярных гормонов (регуляторных пептидов). В частности, в гипоталамусе синтезируется прогормон, который содержит шесть повторов последовательности Glu—His—Pro, из которого в результате гидролиза формируется гормон тиролиберин: $\text{ругоGlu—His—ProNH}_2$. Низкомолекулярный тиролиберин в свою очередь регулирует синтез в аденогипофизе гормона тиротропина, полипептида с молекулярной массой 28 300 Да (Oxford Dictionary..., 1997). По-видимому, именно участие олигопептидов в инициировании процесса транскрипции высокомолекулярных пептидов обеспечивает саморегуляцию процессов белкового синтеза.

При исследовании регуляторных свойств компонентов, выделенных из различных тканевых экстрактов, нами была выдвинута «концепция о существовании в организме цитомединов, представляющих собой одну из групп информационных молекул, которые участвуют в поддержании структурного и функционального гомеостаза клеточных популяций» (Морозов, Хавинсон, 1996).

Обычный подход к отысканию информационного сайта в структуре белка состоит в использовании иммуноспецифических (RIA или FIA) методов. Так, например, был определен участок аминокислотной B_1 -цепи ламинина, ответственный за адгезию эпителиальных клеток, — нонапептид CDPGYIGSR. Дальнейшие исследования показали, что этот пептид может быть укорочен до YIGSR с полным сохранением аффинного связывания с рецептором ламинина и влияния на адгезию клеток; но исключение Y или R резко снижает специфическую активность. Именно указанный

пентапептид является сигналом для осуществления адгезии эпителиальных клеток (Graf et al., 1987).

Кроме эмпирического поиска информационно значимых участков пептидной цепи в настоящее время развивается и теоретический подход к этой проблеме — статистический анализ последовательности элементов в цепях ДНК и полипептидах (Herzel et al., 1994; Atchley et al., 2000; Weiss et al., 2000). Этот подход позволяет оценить устойчивые последовательности аминокислот (консервативные блоки) в определенном белке и рассчитать конфигурационную энтропию его цепи. Опираясь на теорию эндогенного происхождения РП в результате поэтапного гидролиза белковых предшественников, можно предполагать, что именно эти блоки могут проявлять регуляторную активность.

Статистический подход к исследованию аминокислотной последовательности существенно отличается от статистической механики теории газов. В отличие от молекул газа, которые могут свободно меняться местами в пространстве, элементы полипептидной цепочки не могут быть переставлены произвольно. Фиксированное расположение аминокислотных остатков вдоль цепи соответствует определенному порядку, и мерой этого порядка является энтропия последовательности. Если пептид состоит только из остатков одной аминокислоты (гомополимер), то вероятность найти этот аминокислотный остаток на любом месте в цепочке равна 1, а энтропия последовательности цепи равна 0, т. е. минимальна. Эту статистическую определенность расположения остатка в цепи не следует путать с определенностью конфигурации цепи.

В термодинамике полимеров (в том числе полипептидов) при статистических расчетах используется понятие «конфигурационная энтропия», возникшее из представления о поворотной изомерии полимеров (Волькенштейн, 1981). Энергия в синтетическом или природном полимере распределяется не по звеньям (мономерам), а по отрезкам цепи, подвижность которых ограничена точками поворота. Чем больше пространственных конфигураций цепи полимера может осуществиться в результате вращения элементов цепи, тем больше у него степеней свободы и тем выше его энтропия. Как уже упоминалось в разделе 1.2.3, конформационная энтропия полипептидной цепи пропорциональна ее длине и увеличивается из-за разнообразия ее боковых групп и их поворотов. Любая пространственная фиксация определенной конфигурации цепи, которая осуществляется в полипепти-

дах за счет кооперативных внутримолекулярных связей, уменьшает число доступных энергетических состояний и приводит к следующему уровню структурной организации макромолекулы: возникают α - или β -конформации цепи (вторичная структура).

Мы не будем рассматривать конформационную упорядоченность пептидных цепей, а ограничимся рассмотрением последовательности аминокислотных остатков, которая фиксирована ковалентными связями. Тем более что какую бы пространственную конфигурацию ни принимала пептидная цепь, последовательность аминокислот в ней (одномерная первичная структура) остается постоянной.

В состав пептидных цепей входит 20 различных аминокислотных остатков. Их расположение друг за другом вдоль цепи может быть случайным (беспорядочным), и в этом случае энтропия такой последовательности будет максимальной. Как показывают табл. 6 и 7, аминокислоты различаются по востребованности в РП и соответственно образуют повторяющиеся блоки в составе их цепей. Можно предполагать, что эти блоки являются источниками определенных молекулярных сигналов, имеющих информационное значение, так как их состав различается в пептидах, относящихся к регуляции различных физиологических функций.

Как отмечал один из основоположников теории информации Р. Хартли, в обычном понимании термин «информация» слишком эластичен и для каждой области исследования необходимо установить его специфический смысл (Hartley, 1928). Так как в дальнейшем мы столкнемся с проблемой количественного измерения информации, целесообразно уточнить некоторые термины, которые были включены в область молекулярной биологии из областей математической статистики и теории связи.

При исследовании молекулярных систем понятие информации совершенно естественно связано с понятием энтропии. Энтропия является количественной характеристикой хаотичности, разупорядоченности системы; информация характеризует упорядоченность и детерминированность системы, которая необходима для ее воспроизведения. Принято считать, что информация равна энтропии с обратным знаком (Бриллюэн, 1966).

Как известно, собственно задача измерения информации возникла при разработке технических систем передачи информации. Для передачи информации используется система символов (точек, тире, букв, цифр), которые по общему со-

глашению передающей и принимающей сторон имеют определенный смысл. Таким образом, основная задача трансляции информации — максимально точное ее воспроизведение. При установлении количественной меры информации I было принято использовать зависимость

$$I = n \log_2 s,$$

где s — полное число различающихся символов в принятой системе передачи, а n — длина последовательности, составленной из этих сигналов, т. е. длина текста. При этом используется логарифм по основанию 2, а за единицу измерения информации принят «бит» (Hartley, 1928).

При использовании методов теории информации для анализа пептидных структур мы должны пока исключить попытки интерпретации полученных результатов, считая, что каждая комбинация символов (аминокислотных остатков) определяется внутренней системой кодирования, эволюционно закрепленной живыми системами для точного воспроизведения. Поэтому вместо терминов «энтропия сообщения» (word entropy) и «информационное содержание» (content) мы будем использовать термин «информационная нагрузка» (charge), так как на современном уровне знаний содержание и смысл межмолекулярных взаимодействий недостаточно изучены.

При статистических расчетах нужно различать точную информацию и вероятностную. Точная информация отличается от вероятностной прежде всего необратимостью: информационное «сообщение» и форма его выражения имеют начало, определенную последовательность и конец, т. е. этот порядок необратим. Для долгосрочной фиксации точной информации человечество давно использует письменную культуру.

Рассматривая аминокислотные последовательности пептидов-регуляторов, представленных в табл. I—IV Приложения, мы увидим многое, что сближает их строение со структурой письменности. Они состоят из 20 различающихся элементов (аминокислот), имеют начало (N-концевая аминокислота) и конец (C-концевая аминокислота) и не имеют разветвлений. Еще в 60-е годы Дж. Бернал отмечал аналогию в структурной иерархии белков и нуклеиновых кислот с построением языка человеческого общения (Бернал, 1969).

Позднее другой исследователь, Де Дюв, отмечая, что пептиды различаются числом, природой и последователь-

ностью своих аминокислотных остатков, сравнил их со словами разной длины, в написании которых использован алфавит из 20 букв. Это особенно наглядно видно, если в записи использованы однобуквенные символы. Так, например, тетрапептид Cys—Glu—Leu—Leu становится «CELL», а нонапептид Ala—Arg—Cys—His—Glu—Thr—Tyr—Pro—Glu превращается в «ARCHETYPE». «По существу, вся англоязычная литература могла бы быть записана аминокислотным алфавитом, если бы в нем не отсутствовали буквы В, J, O, U, X и Z» (Де Дюв, 1987. С. 43). Проблема состоит в том, чтобы расшифровать тексты того языка, на котором «разговаривают» или «переписываются» друг с другом элементы живых систем, в частности пептиды и клетки, и установить молекулярный (физико-химический) механизм, с помощью которого они обмениваются посланиями. По-видимому, для такой расшифровки необходимо знать тему и предметность, с которой ассоциирован текст.

В свое время для расшифровки кодированных текстов был разработан статистический метод отыскания стационарных участков в последовательности кодирующих знаков. В работах К. Шеннона (1963) и Н. Винера (1983) ставилась определенная цель: предсказать последовательность букв в тексте, когда, например, половина из них отсутствует, но есть частотные характеристики их парных, триграммных и тетраграммных сочетаний.

Со времен пионерской работы Шеннона функция распределения вероятностей в линейной последовательности знаков используется для оценки информационной нагрузки на один знак. В качестве меры упорядоченности и информационной значимости отдельных элементов (букв) текста было принято изменение энтропии последовательности при переходе от случайного распределения элементов в цепи к распределению, учитывающему количество повторов одних и тех же сочетаний букв в данной последовательности. Мы будем пользоваться этим методом при исследовании аминокислотных последовательностей нескольких регуляторных полипептидов.

Вычисление состоит из ряда приближений $F_0, F_1, \dots, F_N$, которые Шеннон назвал N -граммной энтропией, так как она учитывает на каждом этапе более определенные статистические связи между N аминокислотными остатками. Следует подчеркнуть, что этим связям не приписывается никакого энергетического содержания, так же как мы не рассматриваем энергию связи между буквами написанного

слова. Семантическое содержание, т. е. значение, отражающее определенную физическую сущность, также не имеет отношения к количеству информации, вычисляемой для данной последовательности (Shannon, 1951).

Энтропия F_N для коротких последовательностей рассчитывается из обычных частотных таблиц отдельных знаков, диграмм, триграмм и тетраграмм. Для удобства дальнейших количественных сопоставлений энтропия последовательности вычисляется в битах, т. е. с использованием логарифмов по основанию 2.

Для аминокислотного «алфавита» из 20 букв, т. е. для кодируемых 20 аминокислот, нулевое приближение составляет

$$F_0 = \log_2 20 = 4.32 \text{ бит/остаток}$$

в предположении, что все аминокислоты встречаются в составе белка с равной вероятностью (Шеннон, 1963). Однако, как мы увидим, в природных пептидах этого не бывает.

Анализируя распределение вероятности для отдельных аминокислот и их сочетаний в составе каждого белка, можно оценить усредненное изменение энтропии, приходящееся на один аминокислотный остаток, как разницу N -граммной и $(N - 1)$ -граммной энтропий. Изменение N -граммной энтропии, ΔF_N , при добавлении к блоку еще одного остатка измеряет количество информации, которое приходится на добавленный остаток, и рассчитывается по формулам (Шеннон, 1963):

$$F_N = -\sum p(b_i) \log_2 p(b_i),$$

$$\Delta F_N = -\sum p(b_i, j) \log_2 p(b_i, j) + \sum p(b_i) \log_2 p(b_i),$$

где b_i — блок из $(N - 1)$ остатка; $p(b_i)$ — вероятность блока b_i , определяемая из частоты его появления; j — аминокислотный остаток, следующий за блоком b_i ; $p(b_i, j)$ — вероятность блока из N остатков; ΔF_N — среднее значение энтропии одного аминокислотного остатка при его добавлении к предыдущим $(N - 1)$ остаткам.

Вычисления были проведены для нескольких регуляторных полипептидов с длиной последовательности 165—482 аминокислотных остатков (а.о.). Они значительно короче той длины (2.9 млн. а.о.), которая была использована в работе Вейса (Weiss et al., 2000), но достаточны для статистических оценок. В табл. V Приложения представлены их аминокислотные последовательности.

Нейроспецифический кальмодулин-связывающий белок Р-57 был выделен из мембран мозга. Этот белок характеризуется отсутствием упорядоченных участков цепи с α - или β -структурой, и почти половина его аминокислотных остатков имеет гидрофильный характер. Вероятно, он составляет внешнюю часть мембранного рецептора (Wakim et al., 1987).

Тропонин Т — одна из субъединиц белка тропонина, регулирующего сократительную активность актомиозина в полосатой мышце. В отличие от предыдущего белка три четверти аминокислотных остатков тропонина Т включены в состав α -спиральных участков; 50 % аминокислотных остатков имеют ионогенные боковые группы (Leszyk et al., 1987).

Фактор роста эпителиальных клеток, выделяемый тромбоцитами (PDECGF), существенно отличается по молекулярной массе и аминокислотному составу от сосудистого фактора роста эпителиальных клеток (VEGF), хотя их физиологические функции достаточно близки (Heldin et al., 1991). Расчет выполнен также для нейротрофического фактора из глиальных клеток (GCDNF), стимулирующего рост допаминэргических нейронов (Lin et al., 1993), и для мембранного рецептора аквапорина 0, свойства которого мы рассмотрим в разделе 2.2 (Nemeth-Cahalan, 2000). Частотные характеристики аминокислотного состава этих белков были представлены в табл. 6.

Расчет F_N проводили для аминокислотной последовательности каждого белка, читая ее слева направо (от N- к C-концу) и разбивая на блоки по 2, 3, 4 и 5 остатков; аналогично тому, как это было сделано для суммарной последовательности тканеспецифических пептидов в разделе 1.4.1, определяли частоту появления каждой N-граммы (Шатаева и др., 2002).

В табл. 8 представлены результаты расчета F_N ($N = 1, 2, 3, 4$, и 5) для выбранных белков, а также повторяющиеся (устойчивые) блоки аминокислотных последовательностей в их структуре. Для всех указанных аминокислотных последовательностей значение F_1 меньше теоретического значения 4.32 бит/остаток для равновероятного содержания аминокислот в пептиде. Из-за неодинаковой частоты включения аминокислотных остатков в цепь (селективность встраивания аминокислоты в цепь) первичная структура природного пептида оказывается более информативной, чем модельный пептид, содержащий все аминокислоты поровну.

При перечислении содержащихся в последовательности пар аминокислотных остатков в качестве знаков мы факти-

**Средняя информационная нагрузка на аминокислотный остаток (а. о.)
в составе регуляторных белков**

Число остатков в N-грамме	F_N , бит/блок	ΔF_N , бит/остаток	Повторяющиеся блоки	F_N , бит/блок	ΔF_N , бит/остаток	Повторяющиеся блоки
Глиальный нейротрофический фактор (GCDNF), $n = 211$ а. о.				Белок Р-57, $n = 239$ а. о.		
1	4.08	-0.24	A, L, D, S, R	3.51	-0.81	A, E, D, G, R
2	7.00	2.92	DD, KR, RG, RR	6.51	3.0	AE, AP, EA, ED, EP
3	7.64	0.64	AAA, KRL, QAA, TSD	6.84	0.33	APA, AED, AEA
4	7.66	0.02	LTSD, QAAA	7.84	1.0	AEDA, APAA, DAPA
5	—	—	Нет	7.79	-0.05	APAAE
Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), $n = 165$ а. о.				Тромбоцитарный фактор роста эпителиальных клеток (PDEC GF), $n = 482$ а. о.		
1	4.09	—	E, C, R, K, P, Q, F, S	3.82	—	A, E, G, L, R, V
2	6.88	2.79	KP, SC, CR, RC, RQ, GG	7.26	3.44	AA, AL, LV, RV
3	7.24	0.36	KAR, ARQ, CVP, CRP, KPH	8.68	1.42	AAL, GVG, LVL, RAL
4	7.35	0.11	KARQ	8.91	0.23	ALVL, LAPA, PADG
5	—	—	Нет	8.86	-0.05	RVAAA, VAAAL
Тропонин Т, $n = 284$ а. о.				Аквапорин 0, $n = 263$ а. о.		
1	3.42	—	A, E, D, G, R	3.61	—	L, A, G, V, S, F, R, T, P
2	6.79	3.37	AE, EA, ED, EK, ER	6.76	3.15	LG, GA, AV, LA, VG, SL
3	7.74	0.95	AER, AED, EEE, AEE	7.83	1.07	ALA, VAL, RAI, AIC, ASL
4	7.96	0.22	AEDG, EAVE, EREK, RAER	7.90	0.07	VALA, RAIC
5	7.96	0	EAVEE	—	—	Нет

чески переходим от 20-буквенного алфавита к алфавиту, состоящему из 400 знаков, для которого среднее значение энтропии $F_0 = 8.63$ бит/знак при равновероятном присутствии всех знаков в последовательности. Однако большинство исследованных пептидов значительно короче, и далеко не все эти знаки встречаются в составе природных полипептидов.

Интересно сравнить полученные статистические данные для аминокислотных остатков в пептидной цепи с результатами вычислений для последовательности букв в английском тексте, которые сделал К. Шеннон (1963). Нулевое значение F_0 для английского алфавита составляет 4.7 бит/знак. Частота появления этих букв и их сочетаний в тексте дает значения $F_1 = 4.14$, $F_2 = 3.56$, $F_3 = 3.3$ бит/знак. Частотных таблиц английского текста для $N > 3$ в те времена не было, но аналогия полученных закономерностей очевидна.

При увеличении N значение F_N учитывает все более далекие статистические связи. Предельное значение F_N зависит от длины последовательности и равняется $3.32 \lg n$, где n — суммарное число остатков в цепи.

Представленные данные демонстрируют постепенное уменьшение прироста энтропии при добавлении одного аминокислотного остатка к предыдущему блоку. Уменьшение ΔF_N равнозначно повышению информационной нагрузки на один кодирующий знак при переходе от одного аминокислотного остатка к кодирующему знаку в размере ди-, три- и тетрапептида. Наибольший вклад в уменьшение прироста энтропии ΔF_N , т. е. в информативность, вносит число повторений одной и той же регулярной последовательности в данной цепи. Значительное количество повторов дипептидных блоков по сравнению с повторами квартетов не является свидетельством их повышенного информационного содержания. Наоборот, исследование статистики букв и слов в английском языке показывает, что чаще всего в нем встречаются буквы E, H, T и O, а наибольшая частота употребления относится к артиклю the и предлогам of и to, т. е. к словам, не имеющим самостоятельного значения, но определяющим систему отношений между значащими словами (Шеннон, 1963).

Повторяющиеся пептидные блоки у представленных белков не содержат ни ароматических боковых групп, ни гистидина и различаются по содержанию ионогенных и неполярных аминокислотных остатков. При сравнении данных табл. 6 и 8 можно увидеть, что в состав повторяющихся блоков входят только остатки аминокислот, занимающие первые 9 разря-

дов частотности. Наиболее гидрофильные блоки встречаются у тропонина Т, наиболее гидрофобные — в составе аквапорина 0.

Сравнение данных табл. 7 и 8 показывает, что регуляторный белок Р-57 и нейропептиды, принадлежащие к одной функциональной системе, имеют в своих структурах одинаковые димеры и близкие по структуре тетрамеры GEDA и AEDA. Напомним, что 4 аминокислотных остатка представляют собой пространственно заверченный оборот α -спирали без жесткости этой спирали (см. выше, раздел 2.2), и это позволяет тетрапептидным блокам подстраиваться к другим макромолекулам со спиральной конформацией, меняя в допустимых пределах шаг собственной спирали.

Если придерживаться того определения, что здравый смысл — это последовательность суждений, устойчивая к воздействию хаотической внешней информации, то представленные в табл. 8 блоки можно назвать «здравомыслящими», так как они возникли и сохраняются на протяжении тысячелетий среди менее упорядоченных участков пептидной цепи. То, что они повторяются в структуре белка, свидетельствует о важности их информационной нагрузки. Обсуждая проблему повышения надежности информационных каналов мозга и вычислительной машины, Н. Винер отмечал важность дублирования механизмов передачи информации: «Вряд ли можно думать, что передача важного сообщения поручается одному нейронному механизму. Подобно вычислительной машине, мозг, по всей вероятности, действует согласно одному из вариантов знаменитого принципа, изложенного Льюисом Кэрроллом в „Охоте на снарка“: „Что три раза скажу, тому верь”» (Винер, 1983. С. 224).

Представленное в табл. 8 увеличение F_N по мере удлинения анализируемых блоков отражает поэтапный прирост информации в последовательности как разницу средних значений энтропии при увеличении блока на один аминокислотный остаток. Это не очень точная мера, так как распределения вероятностей для димеров, тримеров и более длинных блоков весьма широки. Более точная оценка прироста информации, отнесенного к удлинению соседних блоков, возможна при расчете средних значений разности энтропий для каждого этапа удлинения блока (Эйген, Винклер, 1979).

Представленный метод расчета статистической энтропии пептидной цепи — простейший из используемых, так как он несложен для вычислений. Однако система РП, определяю-

шая непрерывный спектр (континуум) регуляторных функций организма, характеризуется не только набором пептидов, но и их природной иерархией. Для выявления периодических и когерентных сигнальных последовательностей в подобных системах используются методы корреляционного анализа. В последнее время для оценки информации линейной последовательности знаков широко используется метод анализа непараметрических, или ранговых (rank), корреляций (Климонтович, 1999).

Следует, однако, подчеркнуть, что мера информации при всех статистических методах расчета установлена на основе математических, а не биохимических соображений. Оправданием их использования служат эмпирические наблюдения, которые показывают, что любые изменения состояния молекулы, при которых повышаются ее анизотропия или компактность упаковки, сопровождаются уменьшением энтропии и соответствующим увеличением информативности. В частности, значения стандартной энтропии катионных форм аминокислот и олигопептидов в растворе значительно выше стандартной энтропии их цвиттерионных форм (Biochemical microcalorimetry, 1969), т. е. количество информации, заключенной в молекуле цвиттериона, выше, чем в соответствующем катионе. Денатурация белковой макромолекулы, вызванная разрушением нативной структуры, сопровождается, как правило, повышением энтропии. Наоборот, переход полипептидной цепи из глобулярного состояния в α -спираль, т. е. переход от беспорядка к упорядоченности, сопровождается понижением энтропии и соответствующим повышением информационного содержания (Lumry, Rajender, 1970; Волькенштейн, 1981). Простейшее содержание молекулярной информации, которое можно себе представить, отражает устойчивость той или иной формы существования молекулы. Все дополнительное содержание — развитие этого элементарного сообщения.

Возможно, что корреляционный анализ аминокислотных последовательностей позволит выявить определенную взаимосвязь между структурой информационных пептидных блоков и механизмом пептидной регуляции. В перспективе это поможет установить в понятиях физической биохимии «семантическое» содержание информационных молекулярных сигналов.

1.4.3. Роль водородных связей в передаче молекулярных сигналов

Выделение консервативных блоков аминокислот в структурах пептидов и белков может быть использовано не только для оценки их информационной емкости, но и для постановки вопроса о молекулярных механизмах передачи и восприятия информационных сигналов. Сходство строения аминокислотных блоков в составе регуляторных пептидов и высокомолекулярных белков позволяет предположить, что передача информационных сигналов происходит по пути «от подобного к подобному» в соответствии с гипотезой П. К. Климова о том, что регуляторный пептид является молекулярным осциллятором, а передача его информационных сигналов построена по принципу «камертон—резонатор» (Климов, Барашкова, 1993). Молекулярными резонаторами в общем смысле могут быть как участки полипептидных цепей высокомолекулярных белков, так и отдельные области бислойных липидных структур клеточных мембран. В ряде случаев, когда сигнал сохраняется в системе значительно дольше возможного времени жизни полипептида, возникает вопрос о физическом механизме дальнего действия и длительной трансляции сигнала в среде.

Расчеты предпочтительных конформаций пептидов выполняются, как правило, в предположении об изотропном окружении пептидной цепи. Только для достаточно длинных пептидных цепочек, т. е. для белковых макромолекул, учитываются внутримолекулярные гидрофобные взаимодействия жестких, обычно α -спиральных участков друг с другом при упаковке цепочки в глобулу. Это приводит к возникновению ядра молекулы, где сосредоточены гидрофобные аминокислотные остатки (Alberts et al., 1994). Внешние области белковых макромолекул, как правило, гидрофильны, так как боковые группы гидрофильных аминокислотных остатков экспонированы в сторону внешней водной среды и хорошо гидратированы; они участвуют в водородных связях с окружающим растворителем и в реакциях связывания лигандов (Hopp, Woods, 1981). Методами ядерного магнитного резонанса (ЯМР) были измерены скорости изотопного обмена протонов, принадлежащих amino- и амидным группам высокомолекулярных полипептидов, на дейтерий и тритий воды (Knox, Rosenberg, 1980; Krauss, Cowburn, 1981). Эти измерения обнаружили большую разницу в скоростях обмена этих групп, находящихся во внутренних и внешних областях молекулы. Груп-

пы, находящиеся на внешней поверхности, пребывают в постоянном контакте с водой и обменивают свои протоны очень быстро — за доли секунды, тогда как группы, расположенные во внутренних областях белка (т. е. в областях с пониженной полярностью), обменивают протоны очень медленно — за минуты и часы.

По-видимому, эти малые скорости обмена определяются значительным временем релаксации внутримолекулярной подвижности полипептидов. Только изменение внешних параметров среды, например кислотности или температуры, влияет на скорость этих внутримолекулярных движений. Таким образом, большая разница между сравнительно медленной скоростью протонного обмена «пептид—вода» и практически мгновенной скоростью отображения этого обмена на системе водородных связей окружающей воды создает условия для непрерывного мониторинга конформации пептида.

Полифункциональные свойства пептидных цепей обеспечивают их чувствительность к механическим колебаниям и участие в электромагнитных колебаниях. Собственные колебания заряженных (протонированных или депротонированных) ионогенных групп полипептида вызывают обратимые смещения как низкомолекулярных противоионов, так и молекул воды, с ними связанных. Известно, что распространение механических колебаний в водной среде, содержащей заряженные частицы, приводит к локальному смещению положительных и отрицательных зарядов друг относительно друга и к возникновению ионного вибрационного потенциала (ИВП), который имеет ту же частоту, что и возбуждающее его колебание, например ультразвук. В случае заряженных макромолекул и коллоидных частиц в водной среде распространение ультразвука производит аналогичное действие: заряженная частица и окружающая ее «ионная атмосфера» осциллируют, индуцируя коллоидный вибрационный потенциал (КВП). Как правило, амплитуда КВП на несколько порядков больше амплитуды ИВП, и этот эффект используется в гидрофонах (Marlow et al., 1988).

Монохроматическая волна распространяется в среде и переносит энергию с определенной скоростью, но передать информационный сигнал с помощью монохроматической волны, очевидно, нельзя из-за ее однородности в пространстве и во времени. Для передачи информации нужно менять амплитуду или фазу волны. Математический аппарат решения этой задачи известен (Рабинович, Трубецков, 1984).

Среди многих возможных моделей молекулярного дальнего действия, пригодных для трансляции упорядоченных информационных сигналов, мы рассмотрим только системы сопряженных водородных связей, которые существуют как в пептидах, так и в окружающей их водной среде. На расстоянии 5—25 Å вокруг пептидной цепи с большой скоростью происходят конформационные перестройки водородных связей гидратной воды, отражающие состояние пептида. Эти изменения можно наблюдать по спектрам ЯМР, как это представлено на рис. 8, А. В разделе 1.2.3 мы уже упоминали о фундаментальной взаимосвязи между конформационными переходами пептидной цепи и изменением характера ее локальной гидратации. На рис. 8, Б представлено возрастное уменьшение прочности клатратных структур в колагене, что соответствует дегидратации соединительной ткани у различных животных.

Для изучения структуры гидратной воды и подвижности ее протонов существуют три диапазона электромагнитных колебаний: рентгеновский, инфракрасный и радиодиапазон. В молекулах воды наиболее низкими частотами ($4 \cdot 10^4$ Гц) характеризуются колебания ядерных спинов, соответствующие переходам между основным состоянием молекулы, когда спины протонов антипараллельны, и возбужденным состоянием, когда они параллельны. Эти частоты малы по сравнению с частотами обмена протонами между молекулами воды (10^{13} — 10^{14} Гц) и относятся к радиодиапазону. Интересно, что по порядку величины они сравнимы с механическими колебаниями (10^2 — 10^4 Гц), т. е. звуковыми волнами музыкального диапазона (Габуда, Ржавин, 1978). На рис. 8 представлен диапазон электромагнитных колебаний, используемых для изучения структуры гидратной воды.

По-видимому, низкочастотный (в радиодиапазоне) ЯМР-спектр связанной воды может дать уникальную информацию о взаимодействиях регуляторных пептидов с системой водородных связей воды.

При рассмотрении молекулярных осцилляторов мы должны учитывать особенности их строения и соответствующие диапазоны частот колебаний, в которых они могут принимать участие.

Первая характерная черта олигопептидов, подробно обсуждавшаяся в разделе 1.2.1, — это их пространственная асимметрия, которая включает структурную (компонентную) неоднородность, хиральность, неоднородное распределение электростатических зарядов и соответствующий усредненный вектор собственного дипольного момента.

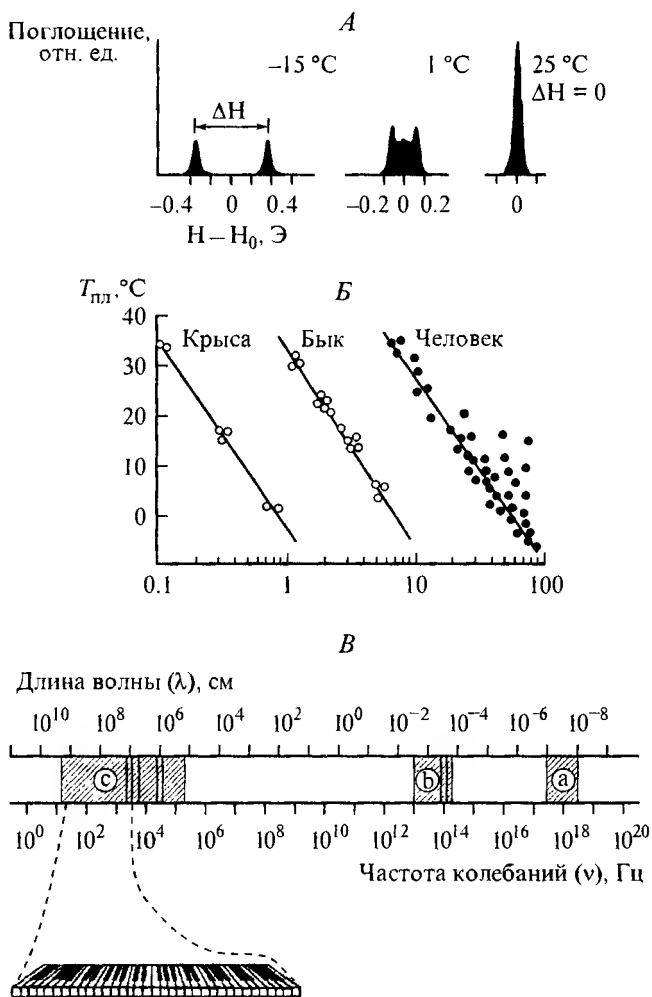


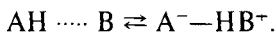
Рис. 8. Исследование клатратных структур в коллагене с помощью ЯМР-спектроскопии (Габуда, 1982; рисунок приводится с разрешения автора).

А — изменение ЯМР-спектра протонов воды при разрушении клатратных структур в результате повышения температуры в гидратированном коллагене; *Б* — зависимость между температурой плавления гидратов коллагена и возрастом (число лет) человека и животных; *В* — шкала электромагнитных колебаний и три основных диапазона для изучения структур гидратов: *а* — рентгеновский, *б* — инфракрасный, *с* — радиодиапазон. Некоторые частоты колебаний протонных спинов в связанной воде относятся к звуковому диапазону.

Вторая особенность олигопептидов — неоднородное распределение вдоль цепи гидрофильных и гидрофобных боковых групп, в результате чего возникает неоднородность гидратации, включающая разный тип гидратации карбоксильных и аминогрупп. Это приводит к характерному для данного олигопептида чередованию гидратных и клатратных структур связанной воды (Габуда, 1982).

Третья особенность олигопептидов — неоднородное распределение групп, способных вступать в водородные связи как с растворителем, так и с соседними группами. При определенных условиях водородная связь может сопровождаться переносом протона к протон-акцепторному атому и образованием ионной пары.

Внутримолекулярные ион-ионные связи в пептидах — большая редкость, а в коротких олигопептидах они не осуществляются по стерическим причинам. В большинстве случаев полярные межмолекулярные взаимодействия пептидов основаны на притяжении карбоксильных и аминогрупп. Такое взаимодействие не является чисто ион-ионным, так как взаимодействующая пара находится в двух энергетических состояниях:



Подобная молекулярно-ионная таутомерия имеет квантовый характер и потому химически не лимитируется.

Механизм и закономерности возникновения водородных связей с переносом протона детально изучены на примере низкомолекулярных протон-донорных и протон-акцепторных соединений. В этих исследованиях широко использованы методы инфракрасной (ИК) спектроскопии. Колебательные спектры партнеров (например, кислотной группы А и основной группы В) при образовании комплекса $\text{АН} \cdots \text{В}$ изменяются сильнее и специфичнее всех других физико-химических свойств системы (Йогансен, 1981). Изменения ИК-спектра отражают 1) появление нескольких новых колебаний новой частицы $\text{АН} \cdots \text{В}$ вместо исчезающих трансляций и вращений молекул АН и В; 2) радикальные изменения характеристических колебаний атома водорода в группе АН ($\nu_{\text{АН}}$); 3) сдвиги частот некоторых скелетных колебаний молекул, содержащих группы АН и В.

Дипольный момент водородной связи обычно не превышает 2—3 Д, тогда как дипольный момент ионной пары достигает величины 15 Д, т. е. в 4 раза больше дипольного мо-

мента пептидной связи и в 8 раз больше дипольного момента воды. Поэтому локальная ориентация молекул воды в гидратационной оболочке взаимодействующих групп будет перестраиваться в зависимости от смещения равновесия в одну или другую сторону. Скорость таких перестроек соответствует частоте обмена протонами между молекулами воды и имеет диапазон величин 10^{12} — 10^{13} с⁻¹, т. е. значительно выше скорости смещения таутомерных равновесий.

Кроме ЯМР- и ИК-спектроскопии при исследовании водородных связей с переносом протона в биополимерах широко используется метод рентгеноструктурного анализа. Теоретические расчеты на основании полученных данных показали возможность формирования триплетных структур связанной воды фрактального типа, т. е. структур, сохраняющих группу симметрии в больших масштабах, чем молекулярные (Бульенков, 1990). Эффективная подвижность протонов в подобных структурах должна быть еще выше, так как она не лимитируется частотой обмена протонами между отдельными молекулами, а определяется физическими свойствами протона.

Особенность протона, отличающая его от всех заряженных ионов в воде, состоит в том, что он не имеет электронов вокруг ядра, так что его радиус равен 10^{-13} см, т. е. на пять порядков меньше, чем радиус обычных ионов. Поэтому перенос протона от молекулы к молекуле происходит без перестройки электронных структур и без участия сил отталкивания между электронами (Белл, 1977). В определенном смысле физические свойства протонов в воде совпадают с физическими свойствами элементарных частиц.

Вычисления показывают, что длина волны протонов, движущихся при нормальной температуре с тепловой скоростью, определяемая по уравнению де Бройля

$$\lambda = \frac{h}{mv},$$

равна 10^{-8} — 10^{-9} см. Можно предполагать, что при перестройке локальной водородной связи трансляция этого процесса в воде может происходить по механизму туннелирования протона, т. е. в результате «подпорогового» преодоления энергетических барьеров (Белл, 1977; Гольданский, 1979). На том же основании можно предполагать определяющую роль протонов клатратной воды в пространственном распространении сигналов об установлении водородных связей регуляторных пептидов с рецепторными белками.

Митчелл придавал особое значение протонам и динамике кооперативных водородных связей в биологических системах, используя понятие «протонно-движущей силы» по аналогии с электродвижущей силой (ЭДС). В середине 50-х годов, когда интенсивно начали развиваться работы по изучению структуры и функций митохондриальных мембран, квантовая электроника развивалась в области закрытых технологий, а понятие «полупроводник» еще не вошло в биофизику. Митчелл фактически ввел аналогичное понятие в биофизику мембран: он постулировал анизотропию проводимости для протонов в митохондриальных мембранах (см.: Mitchell, 1976).

В следующей главе мы подробнее рассмотрим строение биологических мембран. Их структурные особенности обеспечивают не только участие мембран и их рецепторов в межмолекулярных взаимодействиях с пептидами, но и функцию упорядоченной диэлектрической среды, специально предназначенной для распространения и усиления электромагнитных колебаний определенной частоты.

Транспорт энергии с помощью протонов очень прост, так как требует только тонкой, топологически замкнутой мембраны, непроницаемой для воды, которая расположена между двумя протон-проводящими средами, различающимися концентрацией свободных протонов. Иначе говоря, между двумя средами, разделенными мембраной, должна поддерживаться разница значений рН. Эти условия необходимы не только для функционирования протонного насоса, но и для трансляции информационных сигналов из внешней среды во внутриклеточное пространство и для сопряжения окислительно-восстановительных реакций с системами подвижных водородных связей в каждой среде.

Митчелл предложил ввести в биофизику понятие «proticity» по аналогии с «electricity», указывая на определяющую роль «протонных насосов» в энергетике живой клетки (Mitchell, 1976). Используя русские суффиксы, мы можем перевести этот термин как «протоника» (по аналогии с «электроникой») и использовать данное понятие не столько для процессов переноса энергии, сколько для процессов трансляции молекулярной информации между живыми клетками и организмами в водной среде.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПЕПТИДОВ С КЛЕТОЧНОЙ МЕМБРАНОЙ

Можно считать, что элементарной биологической единицей, способной самостоятельно существовать при отсутствии других живых организмов, является клетка. Она отделена от окружающей среды цитоплазматической (плазматической) мембраной, которая обеспечивает постоянство внутреннего состава клетки вне зависимости от изменений окружающей среды. Иначе говоря, она обеспечивает многие (но не все) механизмы саморегуляции клетки. Как известно, биологические мембраны состоят из фосфолипидов, образующих липидный бислой, и белков, встроенных в этот бислой. Иногда их называют интегральными белками. Механическая прочность таких мембран невелика и не может обеспечить защиту клетки от внешних механических повреждений. У простейших микроорганизмов (бактерий) дополнительную защитную роль играет внешняя клеточная стенка, основными компонентами которой являются пептидогликаны. Клетки высших организмов не имеют жесткой клеточной стенки, но их плазматическая мембрана окружена внешней оболочкой (так называемым экстрацеллюлярным матриксом, или гликокаликсом), который состоит главным образом из кислых полисахаридов и гликопротеинов.

Внутреннее пространство живой клетки содержит разветвленную сеть мембран эндоплазматического ретикулума. Кроме того, присутствующие в цитоплазме органеллы также окружены собственными мембранами (ядро, митохондрии, липосомы, пероксисомы). С точки зрения современной технической мембранологии, клетка эукариот является многокамерным и многофункциональным мембранным устройством. При таком подходе всю жидкость организма можно разделить на экстрацеллюлярную и интрацеллюлярную. Экстрацеллюлярная жидкость включает интерстициальную жидкость, лимфу и плазму крови, что составляет приблизительно

Биологические мембраны разных классов (по: Кагава, 1985)

Вид мембраны	Место нахождения
Плазматическая	Поверхность раздела клетки и внешней среды
Ядерная	Поверхность, отделяющая ядро от клеточной протоплазмы
Лизосомальные, митохондриальные и пероксисомальные	Замкнутые органеллы внутри цитоплазмы
Гладкий эндоплазматический ретикулум и шероховатый эндоплазматический ретикулум — место присоединения рибосом	Мембраны, образующие разветвленную сеть внутри клеточного пространства, соединенную с плазматической мембраной
Внешняя клеточная оболочка, базальная мембрана и клеточная стенка простейших	Внешняя поверхность клетки, отделяющая ее от окружающей среды

но 15.5 л в организме человека весом 70 кг. Объем интрацеллюлярной (внутриклеточной) жидкости достигает 26.5 л (Oxford Dictionary..., 1997). Эти объемы разделены плазматическими клеточными мембранами, площадь которых достигает многих сотен квадратных метров. Интрацеллюлярная жидкость содержит более высокие концентрации калия, магния, сульфатов и фосфатов и пониженные концентрации бикарбонатов и хлористого натрия по сравнению с экстрацеллюлярной жидкостью. Именно плазматические мембраны осуществляют интенсивный селективный двухсторонний транспорт этих солей, воды и метаболитов, однако особенности трансмембранных потоков высокоспецифичны для каждого типа тканей.

В работе Я. Кагавы (1985) предложена классификация биологических мембран высших организмов. С некоторыми сокращениями эта классификация представлена в табл. 9.

Подвижность плазматической и внутриклеточных мембран обеспечивается цитоскелетом — опорной структурой клетки, которая состоит из немембранных (ламеллярных) структур: микротрубочек и волокон.

В той области клеточной поверхности многоклеточного органа, где происходит взаимодействие с внешней средой (например, эпителиальных клеток тонкого кишечника с содержимым кишечника), расположено множество микровор-

синок, которые увеличивают реальную площадь поверхности для активного и пассивного транспорта метаболитов (Кагава, 1985). В области межклеточных контактов с помощью электронной микроскопии были обнаружены три типа структур: плотный контакт, щелевой контакт и контакт через коннексоны.

В зоне плотного контакта две плазматические мембраны полностью смыкаются, но при этом цитоплазматические пространства двух контактирующих клеток остаются изолированными друг от друга. Эти плотные межклеточные контакты наиболее развиты в эпителии кожи и в эндотелии капилляров мозга, являясь эффективными барьерами для воды и гидрофильных компонентов. В дальнейшем мы ограничимся рассмотрением именно цитоплазматических мембран.

2.1. Строение фосфолипидного бислоя мембраны

Уже давно стало очевидным, что недостаточно рассматривать функции мембран живых клеток с точки зрения химических свойств компонентов, их составляющих, — требуется учитывать не только их физико-химические и электрохимические характеристики, но и пространственную организацию этих компонентов: асимметрию элементов и жидкокристаллическое состояние липидов. Липиды отличаются от трех других основных групп веществ, составляющих живые организмы (белки, углеводы, нуклеиновые кислоты), тем, что не растворяются в водных средах. Эти светло-желтые пастообразные вещества хорошо растворяются в «липидных растворителях» — хлороформе, диэтиловом эфире, бензоле. Классификация разделяет липиды на несколько групп, из которых в состав плазматических мембран входят фосфолипиды и стерины, тогда как триглицериды (жиры) располагаются, как правило, в межклеточном пространстве.

Фосфолипиды представляют собой сложные эфиры глицерина, имеющие, как правило, разные заместители при 1, 2 и 3 углеродных атомах, при этом в позициях 1 и 2 располагаются длинноцепные гидрофобные заместители — алкилы или алкенилы. А в позиции 3 через фосфорно-эфирную группу к липиду подсоединяются гидрофильные группы — холин, этаноламин, серин, глицерин, инозит и фосфорелированные формы инозита. Такая амфифильная природа фосфолипидов определяет их склонность к мицеллообразо-

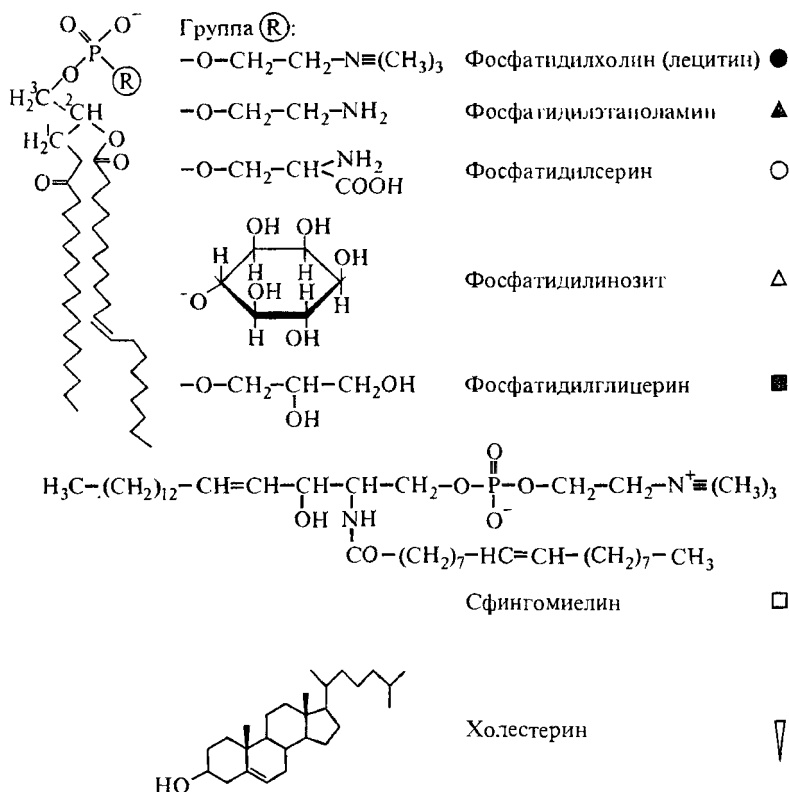
ванию в водных растворах (критическая концентрация мицеллообразования — ККМ порядка 10^{-10} М) и термодинамически выгодную форму мицелл: двойной слой липидов, в котором полярные головки образуют две гидрофильные поверхности на расстоянии 75—80 Å друг от друга, экранируя гидрофобные области (Препаративная биохимия липидов, 1981; Лишко, Шевченко, 1987). На рис. 9 представлены основные элементы структур наиболее часто встречающихся фосфолипидов и схема формирования бислоевой липидной мембраны с встроенной в нее полипептидной цепью (Deenen, 1981; Кагава, 1985).

В настоящее время в фосфолипидах из разных источников обнаружено более 40 вариантов полярных групп и порядка 200 вариантов сочетания гидрофобных цепей. В сформированных бислоях насыщенные углеводородные цепи находятся, как правило, в зигзагообразной конформации и параллельны друг другу. Ось первой ацильной цепи совпадает с осью глицеринового остатка; вторая ацильная цепь после изгиба на участке $-\text{CO}-\text{CH}_2-$ выстраивается параллельно первой цепи.

Полярные группы фосфолипидов, экспонированные в водное окружение, ориентированы в зависимости от знака заряда этих групп: отрицательно заряженные группы фосфатидилсерина направлены перпендикулярно к плоскости бислоя, положительно заряженные группы фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина ориентированы параллельно поверхности липидного бислоя (Браун, Уолкен, 1982).

Фосфатидилхолин (лецитин) содержится в больших количествах в клетках высших организмов (30—60 % от общей суммы фосфолипидов), тогда как его содержание в мембранах бактерий не превышает 6 %.

Исследования как природных, так и синтетических фосфолипидов показали, что константы ионизации ионогенных групп, составляющих полярную головку, располагаются в широком диапазоне от $\text{pK}_a = 2.72$ (фосфатная группа) до $\text{pK}_a = 11.6$ (холин) (Биологические мембраны, 1990; Tótháia-Cotisel, 1999). Холин является одним из самых сильных органических оснований, уступая по силе только боковой группе аргинина, так что полярная головка фосфатидилхолина (ФХ) имеет цвиттерионную структуру в широком диапазоне pH. Наоборот, фосфатидилсерин (ФС) несет две постоянно ионизированные кислотные группы. Таким образом, на обеих поверхностях липидной бислоевой мемб-



Б

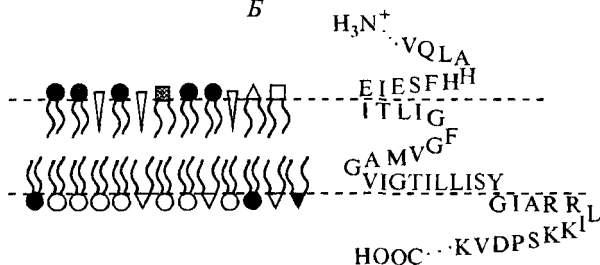


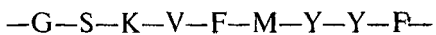
Рис. 9. Основные фосфолипиды, входящие в бислоиные структуры плазматических мембран (А), и схема бислоиной структуры липидов в мембране эритроцита (Б) с встроенной аминокислотной последовательностью участка цепи гликофорина (Препаративная биохимия липидов, 1981; Кагава, 1985; Лишко, Шевченко, 1987).

раны располагаются полярные группы, амфолитные свойства которых сравнимы с амфолитными свойствами аминокислот и пептидов. При этом, хотя углеводные цепи фосфолипидов, расположенные между двумя амфолитными поверхностями липидного бислоя, имеют чисто гидрофобную природу, вся структура оказывается достаточно проницаемой для молекул воды. Как искусственные, так и природные бислойные мембраны имеют проницаемость для воды порядка $2 \text{ мл}/(\text{см}^2 \cdot \text{с})$ (Кагава, 1985).

Ранее предполагалось, что свойства биологических мембран во многом определяются структурой именно липидного бислоя, так что общая замкнутая граница живой клетки подобна мыльному пузырю. За последние 20 лет в результате детального исследования строения и подвижности компонентов, входящих в состав биологических мембран, произошли существенные изменения в представлениях о структуре и функциях клеточной мембраны. Функциональное значение липидного бислоя оказалось значительно шире, чем значение гидрофобной перегородки между внутренним пространством клетки и внешней средой.

Динамическая структура липидного бислоя наиболее полно изучена на примере искусственных бислойных везикул. Эти исследования показали, что молекула фосфолипида как целое может вращаться вокруг своей продольной оси и имеет достаточно высокую подвижность в слое с коэффициентами латеральной диффузии 10^{-7} — $10^{-9} \text{ см}^2/\text{с}$. Полярные головки образуют на поверхности короткоживущие (10^{-6} — 10^{-7} с) кластеры из 20—30 молекул, в результате чего могут возникать временные дефекты в структуре бислоя. Диффузия молекул воды через липидный бислой возможна при их попадании в эти свободные объемы между гидрофобными хвостами липидов. Молекулы фосфолипидов, находясь в бислое, могут осуществлять перескок из одного слоя в другой (флип—флоп). Однако в искусственных бислойных мембранах это происходит сравнительно редко из-за энергетической невыгодности переноса полярной головки через гидрофобный слой (Deenen, 1981). Только селективное взаимодействие с интегральными белками природных мембран может обеспечить быстрый переход фосфолипида из одного слоя в другой. Например, из печени быка был выделен белок, селективно взаимодействующий с ФХ и транспортирующий его с внешней стороны мембраны на внутреннюю, из искусственных везикул в плазматическую мембрану. После гидролиза этого комплекса был

выделен фрагмент пептида, селективно взаимодействующий с фосфолипидом (Etemadi, 1980):



Предполагается, что гидрофобный блок (подчеркнутый) может быть участком, способным связываться с гидрофобной цепью фосфолипида. Обратим внимание на то, что из этих 6 аминокислотных остатков 4 имеют ароматическую боковую группу.

Распределение фосфолипидов разного вида между внешним и внутренним слоем подчинено определенным закономерностям, характерным для каждой ткани. В частности, ФС уникален потому, что он всегда находится на внутренней поверхности мембраны эритроцита. При добавлении экзогенного меченого ФС к эритроцитам он немедленно переносится на внутреннюю поверхность мембраны, так как мембранные белки поддерживают асимметричное распределение зарядов на двух поверхностях плазматической мембраны. Если же эндогенный ФС появляется на внешней поверхности из-за локального разрушения мембраны, то эритроцит оказывается непригодным для гомеостаза и удаляется из кровотока ретикуло-эндотелиальной системой (Connog, Schroit, 1988).

Липидный состав цитоплазматических мембран имеет определенную тканеспецифичность. В табл. 10 представлены вариации фосфолипидных составов цитоплазматических мембран некоторых клеток. В то же время видовые различия фосфолипидного состава значительно меньше тканевых различий (McMurray, 1973).

Более 60 лет назад Дж. Бернал (1969) предлагал рассматривать отдельные внутриклеточные структуры как жидкие кристаллы. Наиболее очевидный пример глубокой аналогии между жидкими кристаллами и биологической структурой — липидный бислой плазматической мембраны (Браун, Уолкен, 1982).

Фазовое состояние фосфолипидов зависит от температуры: при нагревании наблюдается эндотермический фазовый переход из гелеобразного в жидкокристаллическое состояние. По-видимому, фосфолипиды, имея ограниченное число молекулярных конформаций, самоорганизуются в бислойные мембраны и восполняют разнообразие конформационных состояний за счет фазовых переходов в жидкокристаллических структурах. Эти переходы связаны с возрастанием кон-

Липидный состав плазматических мембран, %
(по: Браун, Уолкен, 1982; Кагава, 1985)

Липидный компонент	Эритроциты	Миеллин	Палочки сетчатки	Гепатоциты
Фосфатидилэтаноламин	20	14	38.5	20
Фосфатидилсерин	11	7	9.2	4
Фосфатидилхолин	23	11	44.5	43
Фосфатидилинозитол	2	0	0	7
Сфингомиелин	18	6	1.3	20
Холестерин	25	25	0	6
Цереброзид	0	21	6.5	—

формационной свободы углеводородных частей липидных молекул. Например, измерение температурной зависимости теплоемкости и энтальпии везикул ФХ обнаружило два фазовых перехода — при 34 и при 41 °С. При этом расстояние между цепями жирных кислот увеличивалось от 0.48 до 0.53 нм (Волькенштейн, 1981). В зависимости от компонентного состава липидного бислоя в нем могут сосуществовать несколько квазиравновесных жидкокристаллических фаз.

В физиологических условиях (выше температуры фазового перехода), фосфолипидный бислой имеет жидкокристаллическое состояние, т. е. обладает одновременно текучестью и упорядоченным расположением элементов. Результатом этой текучести и достаточно высокого поверхностного натяжения на границе с водой является самозамыкание бислоя. Фактически плазматические мембраны никогда не возникают заново: они вытекают и складываются из предшествующих мембран путем добавления дополнительных составных частей (Браун, Уолкен, 1982). Однако принципы самосборки фосфолипидных слоев плазматических мембран пока недостаточно выяснены, хотя процесс новообразования мембран эндоплазматического ретикулаума *de novo* детально исследован методом электронной микроскопии (Бирюзова, 1993). Эти мембраны синтезируются методом репликации на внешней поверхности двойной мембраны клеточного ядра, которое на это время принимает форму боба. На его вогнутой поверхности происходит самосборка мембран, а когда ядро расправляется до сферической формы, они соскальзывают и распрямляют рельеф. Этот пример показы-

вает, что не только одномерные последовательности в полипептидных цепях и спиральных структурах ДНК могут быть матрицами для синтеза комплементарных им одномерных структур. Двумерная поверхность фосфолипидного бислоя также является матрицей для сборки комплементарного фосфолипидного слоя.

Текучесть бислоев зависит от ненасыщенности гидрофобных цепей и от присутствия в мембране дополнительных веществ. В частности, холестерин — один из основных компонентов плазматической мембраны всех эукариотических клеток — существенно влияет на текучесть бислоя (Deinum et al., 1988). В составе мембран эритроцитов присутствует до 30 % холестерина, так как он легко взаимодействует с фосфолипидами, образуя комплексы 1:1. Его плоское стероидное ядро легко проникает в структуру мембраны и увеличивает ориентацию углеводородных цепей в жидкокристаллической фазе: ядра стероидов перекрывают 9—12 углеводородных звеньев в липиде. Наибольшее сродство к холестерину проявляют сфингомиелины. Однако селективность межмолекулярных взаимодействий фосфолипидов друг с другом — отдельная проблема клинической биохимии и в данном разделе мы ее рассматривать не будем (Никифорова, 1981).

Асимметричное расположение положительно и отрицательно заряженных групп фосфолипидов на противоположных сторонах плазматической мембраны приводит к возникновению значительной разности электрохимического потенциала между внешним и внутренним слоями этой структуры. До недавнего времени сравнение электростатических потенциалов фосфолипидных монослоев с потенциалом бислоя, разделяющего две водные фазы, проводилось только для искусственных симметричных мембран, где дипольные составляющие липидных молекул взаимно скомпенсированы. Электростатическая емкость такого липидного бислоя зависит от длины цепи остатков жирных кислот использованных фосфолипидов и достигает величины 0.7—0.8 мкФ/см² (Богуславский, 1978), при этом электросопротивление бислоя составляет 10³—10⁶ Ом · см² (Волькенштейн, 1981).

Особенности, которые отличают клеточные мембраны и их модели от традиционных объектов электрохимических исследований, начинаются с их размеров: это в буквальном смысле слова наносистемы, так как толщина липидного бислоя имеет порядок 7.0—7.5 нм, при том что толщина

полярного внешнего слоя составляет 1.4 нм, а остальная часть мембраны, построенная из углеводородных цепей, представляет собой изолятор. Известные трудности исследования электрохимических процессов на границе раздела «изолятор—раствор электролита» увеличиваются при переходе к этим тонким бислойным мембранам, так как их полярная часть соизмерима с толщиной приповерхностного слоя растворителя.

Неоднородность структуры приграничной зоны клетки определяется не только распределением зарядов фосфолипидов на внешней поверхности мембраны и низкомолекулярных противоионов, с ними связанных, но и структурой прилежащих слоев молекул воды, а также расположением пептидных молекул вблизи этой поверхности. В частности, в структуре аполипопротеинов имеются участки цепи с асимметричным распределением гидрофильных групп, которые способны к организации спиральных структур («колеса Эдмундсона», см. рис. 4). В процессе выделения и очистки эти участки, как правило, теряют спиральную структуру, но при добавлении фосфолипидов доля спиральных участков восстанавливается. Этому способствует взаимодействие боковых групп пептида с полярными (ионизированными) головками фосфолипидов. При этом пептид располагается на фосфолипидном монослое таким образом, чтобы ось α -спирали была ориентирована параллельно поверхности слоя (Поляков, Панин, 2000).

Упорядоченность жидкокристаллического состояния фосфолипидов определяет два свойства цитоплазматической мембраны — спонтанную поляризацию и ее изменения при вариации внешних условий (температуры, внешнего электрического поля, механического давления).

Нативная асимметрия распределения положительно и отрицательно заряженных групп на разных сторонах плазматической мембраны присуща всем природным мембранам. В результате внутренние области липидного бислоя, обладающие низкой диэлектрической проницаемостью, всегда оказываются как бы между обкладками конденсатора, т. е. под действием разности потенциалов между полярными внешней и внутренней поверхностями мембраны. Под влиянием этого внутримембранного электростатического поля гидрофобные части фосфолипидов поляризуются. При этом может иметь место как молекулярная (электронная) поляризация, так и ориентационная поляризация, определяющая упаковку алифатических цепей в мембране и их

жидкокристаллическое состояние. Изменение этого состояния бислоя под действием внешнего электростатического поля влечет за собой в первую очередь изменение мембранного потенциала.

Эффективным внешним электрическим воздействием может быть световая волна. Оптический диапазон частот таков, что они возбуждают колебания только в электронных оболочках, а конформации молекул в структуре бислоя не меняются. Таким образом, гидрофобная прослойка мембраны представляет собой регулярную диэлектрическую среду, которая может служить волноводом для электромагнитных волн, в частности фотонов.

Исследование структуры липидных слоев хлоропластов показало, что в процессе фотосинтеза они, подобно линзе, фокусируют свет на активном слое пигмента хлорофилла (Браун, Уолкен, 1982). Анизотропия жидкокристаллической структуры мембраны определяет ее чувствительность к направлению плоско поляризованного света (Jaffe, 1981). Плотные межклеточные контакты обеспечивают трансляцию подобных электромагнитных сигналов от клетки к клетке, так что вся ткань (или орган) оказывается «информированной» практически одновременно.

Внешние электростатические поля также влияют на клеточную мембрану, но уже воздействуя главным образом на латеральное распределение зарядов на ее поверхности, что существенно меняет поляризацию клетки как целого. Это воздействие экспериментально изучено на ранних этапах развития зародыша лягушки (Hinkel et al., 1981). Было обнаружено, что отростки развивающихся нервных клеток — нейриты — быстрее растут в сторону катода, чем в сторону анода. Аналогично росли дорсальные корешки ганглиев цыпленка — преимущественно в сторону катода. Направление постоянного внешнего электрического поля влияло и на развитие миобластов зародыша лягушки. Миобласты, изначально имевшие сферическую форму, росли перпендикулярно к направлению приложенного поля, так что клетки образующейся мышцы вытягивались поперек линий электрического поля. Это явление наблюдалось только при слабых внешних полях от 70 мВ/мм и ниже, что составляло около 1 мВ на диаметр растущей клетки. Предполагается, что его можно объяснить латеральным электрофорезом мембранных рецепторов, специфических для связывания ростовых факторов, по поверхности клетки в сторону катода (Jaffe, 1981).

Жидкокристаллическая природа липидного бислоя определяет его высокую чувствительность не только к изменению внешних температурных условий и электрических полей, но и к внешним механическим напряжениям. Для плазматических мембран разработана модель двумерного эластомера, который состоит из свободной сети гибких углеводородных цепей (Ивенс, Скейлак, 1982).

В общем случае нельзя рассматривать деформацию двумерной системы как изотропную. Однако, если радиусы кривизны поверхности мембраны много больше расстояния между слоями алифатических цепей бислоевой мембраны (а для эукариотических клеток это условие всегда соблюдается), деформация поверхности всей мембраны будет почти такая же, как для каждого отдельного слоя, и изменение энтропии мембраны будет обратно пропорционально ее растяжению. Эта модель аналогична хрестоматийному примеру уменьшения энтропии при механическом растяжении каучуковой ленты. Основной вклад в изменение свободной энергии этой системы вносит работа, необходимая для упорядочения элементов сети, если при этом плотность материала постоянна. Для таких эластомеров деформация растяжения приводит к малым изменениям внутренней свободной энергии G , так как ее основные изменения напрямую связаны с приращением конфигурационной энтропии S :

$$dG = -T dS,$$

где T — температура. Как уже указывалось, энтропия определяется по уравнению Больцмана через распределение энергии по возможным конфигурациям молекулярной сети, в число которых входят конфигурации разных жидкокристаллических состояний бислоя.

Интересная особенность энтропийных эластомеров состоит в том, что для них модуль сдвига растет с температурой. Иначе говоря, работа по растяжению эластомерной поверхности направлена против процессов теплового разупорядочения, которые протекают в системах, стремящихся к равновесию. Соответственно обратимый теплообмен при растяжении энтропийного эластомера сопровождается в среднем уменьшением степеней свободы молекулярных цепей, уменьшением энтропии и соответствующим возрастанием упорядоченности структуры. В результате возрастает чувствительность мембраны к механическому давлению, в том числе к переменным механическим напряжениям зву-

ковых волн. А сегнетоэлектрические свойства жидкокристаллических структур билипидного слоя позволяют преобразовать эти механические напряжения в электрический сигнал.

Можно предполагать, что таким образом термодинамические свойства липидного бислоя вносят свой вклад в формирование и распространение информационных сигналов о внешней среде и тем самым участвуют в саморегуляции живой клетки и в стабилизации гомеостаза.

Совокупность представленных выше химических, динамических и структурных характеристик липидных бислоевых мембран определяет их функциональные свойства: электровозбудимость; сопряжение механических свойств и поляризуемости; совместимость с ориентированными блоками полипептидных цепей.

Последнее свойство фосфолипидного бислоя имеет фундаментальный характер и заслуживает отдельного рассмотрения.

2.2. Рецепторы плазматической мембраны

Как уже упоминалось, плазматические мембраны представляют собой динамическую структуру, состоящую из липидного бислоя и одноцепочечных мембранных белков, полипептидные цепи которых насквозь прошивают липидный слой. Для совмещения с гидрофобным слоем мембранные белки имеют участки пептидной цепи (домены) с повышенной гидрофобностью боковых групп. Гидрофильные участки этих цепей располагаются на обеих сторонах мембраны. В зависимости от числа трансмембранных доменов и химической ориентации пептидной цепи (от N- к C-концу) различают несколько типов мембранных белков. Тип I имеет один трансмембранный домен, N-конец, экспонированный вовне, и C-конец, расположенный на плазматической стороне мембраны. Тип II тоже имеет один домен и противоположную ориентацию цепи — ее C-конец находится на внешней стороне мембраны. Тип III содержит несколько трансмембранных доменов и внутримембранных петель, при этом оба конца цепи могут оставаться в цитоплазме. Тип IV представляет собой мультимер, т. е. состоит из нескольких субъединиц, трансмембранные домены которых образуют общий трансмембранный канал. Кроме того, некоторые мембранные белки, особенно ферменты, могут быть закреплены на липидном слое мембраны ковалентными связями

через гликозилфосфатидилинозитол (GPI-якорь) или другие гликозидные мостики (Oxford Dictionary..., 1997).

Мембранные белки участвуют во всех процессах метаболизма и выполняют защитные функции. Кроме того, определенные белки устанавливают специфические контакты с внешним окружением — со средой и соседними клетками. Эти белки Сингер назвал информационными, так как они формируют и передают сигналы об окружении внутрь клетки (Singer, 1992). Такое подразделение является условным, так как все процессы на поверхности клетки (ферментные, контактные, транспортные, электрохимические) взаимосвязаны и информация о них поступает внутрь клетки.

Ключ к пониманию этой взаимосвязи заключается в структуре мембранных белков. Это одноцепочечные полипептиды, молекулярная масса которых достигает 800 кДа. Весовое соотношение белковых компонентов и липидов в составе большинства плазматических мембран колеблется от 1 : 4 до 4 : 1 в зависимости от ткани и возраста организма (Като, 1990). При рассмотрении процессов клеточной саморегуляции участки цепей этих белков, находящиеся на внешней стороне мембраны, называют клеточными рецепторами. На границе раздела «мембрана—внешняя среда» в структуре белка могут также существовать так называемые шарнирные области с высоким содержанием пролина и лейцина, которые позволяют внешней цепи (рецептору) совершать вращательные движения и подстраиваться под положение лигандной молекулы (Кульберг, 1987). При изучении процессов клеточного узнавания и формирования иммунного ответа внешние части мембранных белков, чаще всего гликозилированные, называют маркерами клеточной дифференциации (или клеточными детерминантами) и классифицируют по системе CD (Ярилин, 1999).

Участки цепей мембранных белков, проходящие сквозь фосфолипидный бислой, имеют структуру α -спирали с диаметром 4.6 Å. Шаг спирали составляет 5.4 Å, так что для преодоления толщины фосфолипидного бислоя в 65—70 Å требуется 13—14 витков. Однако это очень приблизительная оценка, так как бислой — динамичная структура. Подвижные фосфолипиды активно подстраиваются к α -спиралям, оптимизируя гидрофобные взаимодействия своих ацильных групп с гидрофобными группами пептидных цепей (Dumas et al., 1999). Длина углеводородной цепи (для разных жирных кислот количество атомов углерода в ней варьирует от 12 до 20) должна соответствовать длине гидрофобного участка

α -спирали. Поэтому реальная плазматическая мембрана имеет переменную толщину, зависящую как от структуры мембранного белка, так и от компонентного состава фосфолипидов.

Если внешняя и транслипидная части мембранного белка отвечают за возбуждение и трансляцию информационного сигнала, то внутриклеточная часть пептидной цепи отвечает за адаптационную реакцию клетки. Как правило, внутриклеточная часть мембранного белка, воспринявшая возбуждение от присоединения лиганда к внешнему рецептору, меняет конформацию и степень ассоциированности в системе GTP-связывающего белка, в результате чего происходит дефосфорилирование и начинается каскад адаптивных реакций.

Кроме описанного механизма формирования клеточного ответа существует и другая схема. При осуществлении метаболических и защитных функций рецепторы связывают специфические лиганды (компоненты внешней среды) и затем размещаются в транспортных везикулах, участвуя в процессах эндоцитоза и экзоцитоза (Willeman et al., 1985; Глебов, 1987).

Нужно отметить уникальную способность цитоплазматической мембраны менять свою форму и размеры при формировании эндоцитозных везикул. Внешний слой бислойной мембраны на тех участках, где рецепторы связали внеклеточный материал, сжимается и прогибается внутрь клетки, тогда как внутренний слой фосфолипидов на этом участке растягивается, становится выпуклым и замыкает бислойный пузырек — везикулу. Таким образом, внутренний слой плазматической мембраны становится внешним слоем везикулы, а внешний слой мембраны с ассоциированным внеклеточным материалом оказывается внутренним слоем везикулы. При экзоцитозе комплементарность внешнего и внутреннего слоев фосфолипидной мембраны обеспечивает обратный процесс: прилипание внешнего слоя везикулы к внутреннему слою мембраны, выворачивание везикулы наизнанку и слияние ее фосфолипидного бислоя с цитоплазматической мембраной. При встраивании везикулы в цитоплазматическую мембрану сохраняется компонентный состав внешнего и внутреннего фосфолипидных слоев.

Путем эндоцитоза поглощаются не только специфические рецепторные комплексы, но и трофические полипептиды, которые также стимулируют образование везикул, которые затем транспортируют их в цитоплазму. Этот неспе-

цифический эндоцитоз — один из способов питания клетки (Глебов, 1987).

При эндоцитозе мембранных рецепторов со специфически связанными лигандами лучше всего исследованы процессы образования «одетых» везикул, дополнительно окруженных слоем клатрина. Этот слой формируется около внутренней поверхности плазматической мембраны, окружает бислойную везикулу с мембранными белками и лигандами и транспортируют их к лизосомам или протеосомам, где утилизируются связанные лиганды (Schmid, 1997). Там везикулы разгружаются и возвращаются к внутренней поверхности мембраны. В процессах рециклинга мембранных белков важную роль играет убиквитин — регуляторный пептид, определяющий активность протеосом. В предыдущей главе мы отнесли его к пептидам иммунной системы. В данном разделе следует указать на его активность в процессах специфического эндоцитоза (Strous, Govers, 1999). В следующей главе мы увидим, что убиквитин играет важную роль в структуре хроматина и в регуляции клеточного цикла.

Механизм движения везикул в клетке, очевидно, не диффузионный. Как мы увидим в дальнейшем, внутри живой клетки, как и в отдельных ее органеллах, нет места для диффузионной диссипации энергии. Все движения в клетке управляются межмолекулярными взаимодействиями и локальными электрическими полями. Так организован и транзитоз — транспорт молекул через клетку. Этот процесс характерен для поляризованных клеток, таких как эпителиальные клетки кишечника, которые имеют базальную и апикальную поверхности (каждая со своим определенным фосфолипидным составом), создающие электрическое поле в клетке и определяющие направление транспорта везикул. Примером может служить адсорбция антител, содержащихся в молоке матери, клетками кишечника новорожденного. Эти антитела поглощаются апикальной поверхностью эндотелиальных клеток, переносятся внутри клетки к базальной поверхности и затем выделяются с базальной поверхности в кровь. Аналогично организован механизм секреции тиреоидного гормона. Сначала тиреоглобулин выделяется в просвет фолликула щитовидной железы, затем происходит эндоцитоз тиреоглобулина эпителиальными клетками, в составе везикул он транспортируется через клетку, одновременно подвергаясь частичному протеолизу, и образованный в везикулах низкомолекулярный гормон тироксин секретируется в ближайший кровеносный капилляр.

В защитных реакциях организма по механизму эндоцитоза значительную роль играют неспецифические рецепторы макрофагов. Макрофаги млекопитающих — наиболее эволюционно древние клетки. На их поверхности имеется не менее 30 типов рецепторов, определяющих поверхность чужеродных клеток или антител, но специфичность этих рецепторов невысока. Предполагается, что в основе распознавания макрофагами чужеродных клеток лежит механизм, сходный с процессом адгезии, реализующийся при участии большого количества низкоаффинных рецепторов. Суммарное сродство с клеткой, с которой связывается макрофаг, определяется спектром рецепторов адгезии на клетке-мишени, их концентрацией и распределением на клеточной поверхности. Этот спектр рецепторов и есть «морфогенетический код» (Зубова, Окулов, 2001). Поглощение инородных частиц по механизму эндоцитоза осуществляется после того, как эти частицы обволакиваются комплементом, и рецепторы макрофагов с высокой селективностью распознают собственный активированный комплемент.

Специфичность мембранного рецептора по отношению к клатриновому эндоцитозу определяется аминокислотной последовательностью в сигнальной части его цепи. Как правило, это 4—5 аминокислотных остатков с характерным алгоритмом последовательности. В частности, активированный рецептор эпидермального фактора роста (EGF) интернализуется в клетку путем эндоцитоза в клатриновых пузырьках. Для этого область связывания EGF имеет сигнальный пептид —F—Y—R—A—L—M—, содержащий характерный для эндоцитозных сигналов тирозиновый мотив: —Y—X—X—L—, где X может быть M, I или F. Предполагается, что специфичность связывания может меняться при замене четвертого и последующих гидрофобных остатков рецептора (Marks et al., 1997).

Большинство из известных мотивов в структуре рецепторов имеют именно такой вид — допустимо произвольное замещение второго и третьего аминокислотных остатков (Owen, Evans, 1998). По-видимому, это связано с плотной упаковкой транслипидных α -спиральных участков пептидной цепи рецепторов, принадлежащих к IV типу трансмембранных белков. Их спиральные блоки плотно прижаты друг к другу в виде жгута для уменьшения поверхности контакта с гидрофобным слоем, а более гидрофильные группы находятся на тех ребрах спирали, которые обращены внутрь жгута. Именно гидрофильные ребра α -спиралей составляют транспортные поры для низкомолекулярных ионов и воды. Как

уже упоминалось, в модельных системах использовали каналообразующий пептид из 21 аминокислотного остатка, состоящий из трех повторов α -спирального гептапептида (LSSLLSL)₃. Но для его внедрения в бислойную структуру необходимо присоединение к его N-концу дипептида EW, т. е. фрагмента с ароматической боковой группой (Lear et al., 1997). По-видимому, деструктивное действие пептидных антибиотиков микробного происхождения (тироцидины, грамицидины) на клеточную мембрану также связано с высоким содержанием ароматических аминокислот (Франклин, Сноу, 1984).

Детали структурного взаимодействия рецепторов с пептидными лигандами исследуются с помощью ЯМР-спектроскопии (Pellegrini, Mierke, 1990). Однако особенности нативного строения рецептора в комплексе с лигандом и прилегающими фосфолипидами до сих пор исследованы не полностью. К сожалению, выделение таких мембранных комплексов представляет сложную методическую задачу (Биологические мембраны, 1990). Известно, что при делипидизации многие мембранные белки денатурируют, в частности теряют ферментную активность. Это наблюдалось для ряда мембранных ферментов: Na⁺, K⁺-АТФазы, глюкозо-6-фосфатазы, галактозилтрансферазы и др. Но при добавлении смеси фосфолипидов их активность восстанавливалась. Кроме того, использование поверхностно активных веществ для солюбилизации мембранных структур может способствовать неспецифическому связыванию компонентов из-за образования тройных комплексов (Кравцов, Алексеенко, 1993).

Особая форма специфической рецепции была обнаружена у гормона роста, ответственного за постнатальный рост и обладающего при этом многими функциями, регулирующими метаболизм. В плазме крови был обнаружен белок, селективно связывающий этот гормон (константа ассоциации K_a порядка 10⁸ л/моль) и не имеющий специального гена. Оказалось, что его структура идентична внешней части мембранного рецептора гормона роста. По-видимому, этот полипептид отщепляется от полной структуры рецептора в результате гидролиза (Baumann, 1993). Так как рецепторы гормона роста имеются у клеток всех тканей растущего организма, остается открытым вопрос о механизме гормональной регуляции в условиях, когда гормон связан со свободно диффундирующей частью рецептора.

Как известно, клетки дифференцированных тканей обладают набором тканеспецифических мембранных белков (ре-

цепторов), отражающих их специализацию. Иными словами, имеется жесткая взаимосвязь между тканеспецифическими функциями клеток и структурной организацией их плазматических мембран. Например, миелин, представляющий собой изоляционную оболочку вокруг аксонов нервных клеток, состоит из уплощенных шванновских клеток. Их плазматические мембраны — возбудимые мембраны — передают электрические импульсы, для чего в них имеются специализированные каналы для ионных потоков. Нервные клетки содержат мембранные «белки возбуждения» — трансмембранные полипептиды, исполняющие функции рецепторов, ионных каналов и ионных насосов. Примером также может служить семейство рецепторов глутамата, т. е. рецепторов «возбуждающих» аминокислот. Различают два типа таких рецепторов: ионотропные, регулирующие проницаемость ионных каналов, и метаботропные, связанные с системой фосфолипидных мессенджеров и ингибированием аденилатциклазы. С фармакологической точки зрения, эти два типа рецепторов различаются чувствительностью к активации специфическими агонистами, например N-метил-D-аспаратом. Активированные ионотропные глутамат-рецепторы регулируют проводимость Na^+ , K^+ и Ca^{++} , поэтому их называют иногда лиганд-воротным каналом. Обнаружены также вольт-воротные каналы, также представляющие собой мембранные полипептиды, конформация которых определяется мембранным потенциалом.

Особенностью плазматических мембран нервных клеток является то, что в их состав входят полипептиды, не имеющие трансмембранных участков. Примером может служить основной белок миелина, расположенный на внутренней стороне клеточной мембраны, который не имеет сходства со структурами интегральных белков. Он лишен гидрофобных блоков в аминокислотной последовательности, а расположение ионогенных групп вдоль цепи таково, что полипептид приобретает конформацию клубка, который легко меняет свои параметры при взаимодействии с амфифильными пептидами, что может вызвать аллергический энцефалит и дальнейшее развитие демиелинизации (Кагава, 1985).

Ионные компоненты (электролиты), присутствующие в окружающей среде, влияют не только на нервные и мышечные клетки. Концентрации кальция, магния, аммония и ионов водорода определяют конформации многих мембранных рецепторов. Кальций сосредоточен главным образом в костных тканях и не может быть быстро мобилизован для

участия в метаболизме. Определенные запасы кальция связаны с гликопротеинами и углеводами в межклеточном пространстве, тогда как внутриклеточная концентрация ионов кальция на несколько порядков ниже концентрации однозарядных ионов. За счет высокого градиента концентрации кальций играет значительную роль в регуляции потенциала и проницаемости плазматических мембран, а при переносе в цитоплазму становится регулятором активности вторичных мессенджеров — диацилглицерина и инозит-трифосфата (Левицкий, 1990). Механизм его регуляторной функции заключается в том, что при связывании с пептидной цепью кальций существенно меняет ее конформацию. Селективными носителями кальция являются кальмодулин и тропонин Т, которые связывают по 4 атома Са.

Среди низкомолекулярных модуляторов конформаций клеточных рецепторов первое место принадлежит ионам водорода, так как в физиологических условиях незначительное изменение кислотности может на два порядка изменить степень ионизации боковых групп пептида.

В частности, сравнительно недавно было найдено, что направленный транспорт воды в живую клетку осуществляется с помощью специальных трансмембранных белков — аквапоринов (Lieburg, 1995). К настоящему времени охарактеризовано более десятка представителей этого класса мембранных белков. Они все имеют по 6—8 трансмембранных α -спиральных участков и обладают значительной гомологичностью этих структур. Белок аквапорин 0 относится к классу самых эволюционно консервативных белков и найден в составе различных тканей (Nemeth-Sahalan, Hall, 2000). При исследовании набухания ооцитов было установлено, что понижение рН внешнего раствора от 7.2 до 6.5 увеличивает проницаемость клеточных мембран для воды в 3—4 раза. Изучение этого эффекта при вариации аминокислотных остатков в полипептидной цепи аквапорина 0 показало, что рН-регуляция водного потока в клетку осуществляется всего одним аминокислотным остатком His⁴⁰, расположенным на внешнем участке белка, имеющего в составе 263 аминокислотных остатка. Значение рK_a гистидила находится в области рН 7.0. Снижение рН внешнего раствора до 6.5 приводит к протонированию имидазольного кольца и соответствующему переходу его гидратации от клатратной к гидратной. Это открывает канал для интенсивного транспорта воды внутрь клетки. В предпоследнем столбце табл. 1 (см. главу 1) представлены значения гидро-

фобности для аминокислотных остатков в деионизированном состоянии. Протонирование кольца гистидила и его переход в состояние гидрофильного остатка сопровождаются соответствующим изменением его гидрофобности от -1 до -7 кДж/моль, что превышает энергию гидролиза АТФ до АДФ.

Другой пример относится к аквапорину 1. Этот мембранный тетрамер принадлежит к IV типу трансмембранных белков и отвечает за поддержание оптимальной концентрации воды в клетке. Домены аквапорина 1 образуют в мембране высоко специфические каналы для воды, которые не пропускают даже ионы водорода и гидроксила, не говоря уже о других электролитах. При исследовании аминокислотной последовательности аквапорина 1 была проведена количественная оценка гидрофобности его трансмембранных доменов и рассчитано уменьшение конформационной энтропии этих доменов при переходе от вытянутой пептидной цепи к α -спирали, погруженной в липидный бислой. Энтропийная составляющая уменьшения свободной энергии составила 83 кДж/моль. Расчеты показали, что это соответствует среднему увеличению молекулярной информации за счет гидрофобных взаимодействий (без учета статистики распределения аминокислотных остатков) на 0.6 бит/а. о., или в среднем на 15 бит на один трансмембранный домен (Neuman, Engel, 2000).

Значительный запас конформационной энергии спиральной пептидной цепи рецептора в липидной мембране объясняет молекулярный механизм усиления сигнала после взаимодействия рецептора с лигандом. Поскольку при этой конформации все торсионные углы цепи жестко связаны друг с другом, даже небольшое изменение поворота или гидратации одного аминокислотного остатка из-за взаимодействия с лигандом приводит к согласованному, т. е. кооперативному, изменению конформации всей цепи. Поэтому воспринятый клеткой (или соседними рецепторами) сигнал будет многократно усилен за счет кооперативного увеличения свободной энергии пептидной цепи рецептора.

Среди всех перечисленных выше особенностей белков цитоплазматической мембраны самой главной является их структурная комплементарность с углеводородными цепями фосфолипидов на тех участках, которые «прошивают» мембрану. Поэтому конформационные переходы на этих участках и их энергия должны рассматриваться в совокупности с изменениями жидкокристаллической структуры прилегающего липидного бислоя.

2.3. Взаимодействие регуляторных пептидов с рецепторами и фосфолипидами

Концепция специфических рецепторов на клеточной поверхности была выдвинута Паулем Эрлихом в начале XX в. Для объяснения специфичности рецепторов использована модель «ключ—замок», ранее разработанная Фишером для селективного ферментного катализа. Нужно отметить, что пространственное совпадение элементов типа «ключ—замок» — очень устойчивый алгоритм воображения, основанный на бытовых навыках. Огромный экспериментальный материал электроэнцефалографии практически ничего не прибавил к этой механической модели. При моделировании взаимодействия регуляторных пептидов с мембранными рецепторами предполагается, что определенный участок рецептора зеркально и комплементарно соответствует структуре лиганда (Говырин, Жоров, 1994). Внешние участки некоторых рецепторов частично сходны с вариательной частью молекулы γ -глобулина, поэтому на схемах их изображают в виде вилок. На основании этой же модели предполагается, что некоторые синтетические пептиды могут частично комплементарно совпадать с Fc-участком иммуноглобулинов, возбуждая аллергическую реакцию организма.

Наиболее детально исследована специфичность регуляторных пептидов, вызывающих высвобождение гистамина из тучных клеток кишечника (Jasani et al., 1979). Сравнение активности пептидов в широком диапазоне размеров и вариаций аминокислотных последовательностей (в том числе различных фрагментов АКТГ) с активностью дегранулирующего пептида показало только, что для проявления активности необходимо присутствие в цепи блока с четырьмя щелочными аминокислотными остатками и амидированного С-конца пептида. Но все варианты были на 2—4 порядка менее активны, чем природный дегранулятор. Иными словами, широкий спектр регуляторных пептидов может стимулировать выделение гистамина из тучных клеток, но каждый из них действует только в определенном диапазоне концентраций.

Более современный подход к изучению пептидной регуляции заключается в том, чтобы установить каскад последовательных взаимодействий, в результате которого меняются конформации как липидных, так и пептидных компонентов мембраны и в клетку поступает соответствующий

информационный сигнал. Оказалось, что некоторые пептидные регуляторы ингибируют или активируют ферменты, находящиеся на поверхности или вблизи поверхности клеточной мембраны.

В частности, ряд пролинсодержащих пептидов, которые являются фрагментами пищевых белков (IY, VW, IW, VAP, IKP, LRP, IRP и др.), ингибирует мембранный фермент, который преобразует ангиотензин-I в ангиотензин-II и инактивирует брадикинин (Yamamoto, 1997). Эта цинк-содержащая пептидаза находится на мембранах эндотелиальных клеток сосудов и нейроэпителиальных клеток. Ее самый сильный ингибитор найден среди пептидов змеиных ядов — ругЕКВАР. Пищевые пептиды являются конкурентными ингибиторами и определяют заметное антигипертензивное действие молочнокислых продуктов, так как именно молочнокислые бактерии, гидролизуя казеин, высвобождают эти ингибиторы. Таким образом, регуляторное действие этих пептидов определяется ингибированием мембранного фермента.

Другой пример: фактор роста фибробластов (полипептид из 140 аминокислотных остатков) активирует фосфолипазу C_2 , в результате чего резко возрастает концентрация инозитола-1,4,5-трифосфата (вторичный мессенджер) в цитозоле. Это сопровождается ионотропным ответом миокарда. Таким образом, действие ростового фактора сводится к временному повышению активности ряда гидролаз и изменению заряда и потенциала плазматической мембраны из-за гидролиза фосфолипидов (Tarrpia et al., 1999).

Эти наблюдения подтверждают данные о значительной роли фосфолипидов в саморегуляции клетки, так как они являются предшественниками молекул-мессенджеров (диацилглицерина, фосфатидовой кислоты, церамидов), действующих как на поверхности клетки, так и в цитозоле, активируя систему G-протеина и последующих реакций (Morris, 1999).

Среди регуляторных ферментных реакций, модифицирующих фосфолипиды мембраны, отмечены не только гидролиз, но и фосфорилирование инозина GMP-зависимой киназой, связанной с тропонином T (Yuasa et al., 1999). Известно, что «головка» фосфатидилинозина может связывать до трех групп фосфата, что резко повышает локальную плотность отрицательных зарядов. Изменение распределения зарядов на мозаичной поверхности плазматической мембраны само по себе может быть сигналом, передаваемым

мым мембраной внутрь клетки или соседним клеткам в местах плотного контакта.

Необходимо отметить важную роль сиаловой кислоты, которая является концевым звеном гликозидной части многих мембранных рецепторов и детерминант и имеет постоянный отрицательный заряд. Кроме того, она входит в состав гликосфинголипидов плазматической мембраны нейронов и синаптической мембраны и принимает участие в процессе выделения нейротрансмиттеров. Процесс возбуждения мозга также происходит с участием сиаловых кислот. Целый ряд возрастных патологий мозга, в том числе болезнь Альцгеймера (БА), сопровождается общим снижением уровня сиалсодержащих ганглиозидов и цереброзидов (Reutter et al., 1982).

Для объяснения особенностей воздействия нейропептидов и ядов на тучные клетки кишечника, в результате которого высвобождается гистамин, была предложена модель безрецепторной активации системы G-белка (Mousli et al., 1990). Было отмечено, что активность исследованных амфифильных пептидов и нейротоксинов (все они имеют блоки щелочных аминокислотных остатков) подавлялась низкими концентрациями кальция, гидрофобными четвертичными аминами и не проявлялась, если клетки были предварительно десенсибилизированы нейраминидазой. Все это свидетельствует об участии отрицательно заряженных групп на поверхности тучных клеток в связывании регуляторных пептидов.

Как уже указывалось, для сохранения нативной структуры и активности мембранных белков необходимо присутствие мембранных фосфолипидов. Поэтому вещества, изменяющие состав и свойства фосфолипидного бислоя, тем самым влияют на функциональные свойства мембранных белков. Например, локально действующие анестетики разрушают структуру липидного бислоя, что приводит к нарушению функций натриевых каналов. По-видимому, опиоидные пептиды могут аналогично действовать на клеточную мембрану.

В известной мере эти факты уравнивают возможности мембранных пептидных рецепторов и фосфолипидов селективно воспринимать изменения внешней среды, соответственно менять собственную конформацию и передавать информацию об этом не только внутрь клетки, но и соседним клеткам по системе контактов бислойных клеточных мембран. Поэтому в настоящее время интенсивно развиваются флуоресцентные и колориметрические методы исследования

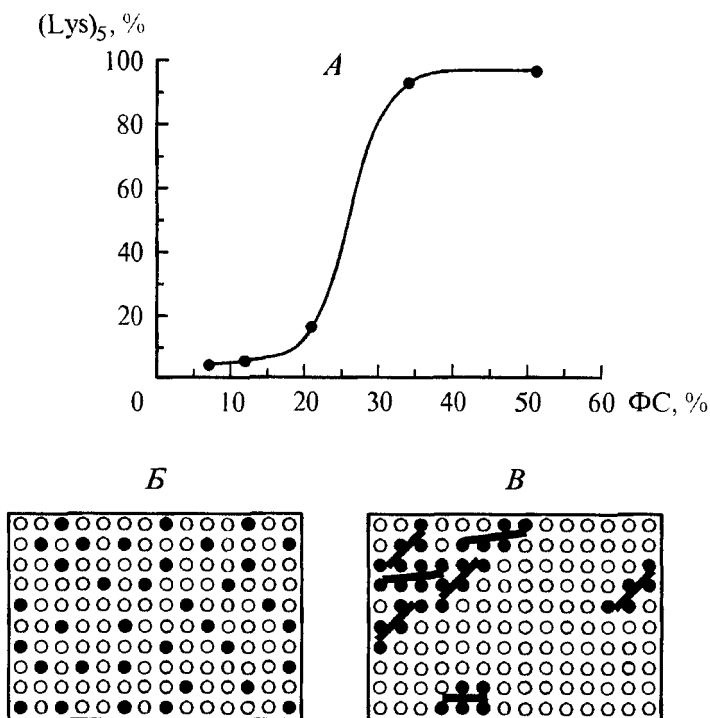


Рис. 10. Зависимость связывания пентализина с поверхностью фосфолипидной мембраны от содержания в ней фосфатидилсерина (*A*) и переход от равномерного распределения фосфатидилсерина (*B*) к кластерам пентализин—фосфатидилсерин (*B'*).

межмолекулярных взаимодействий регуляторных пептидов с фосфолипидными мембранами (Добрецов, 1989; Kolusheva et al., 2000).

Относительно недавно было исследовано взаимодействие щелочного олигопептида (пентализина) с модельной фосфолипидной (ФХ/ФС) мембраной при разных концентрациях кислого фосфатидилсерина в ее составе (Denisov et al., 1998), как показано на рис. 10. Нелинейный характер графика определяется изменением самоассоциации заряженных групп ФС на поверхности мембраны и кооперативным эффектом при адсорбции пептида. Если при отсутствии пептида отрицательно заряженные группы фосфатидилсерина равномерно распределены по поверхности из-за взаимного отталкивания, то сорбция положительно заряженного олигопептида собирает их в кластеры, нарушая равномерное распределение по поверхности. При малых концентрациях

фосфатидилсерина это нарушение невелико (начальный участок), но при увеличении концентрации повышается селективность связывания олигопептида. Очевидно, что при этом в области кластеров меняется и локальная поляризация мембраны.

При установлении межмолекулярных связей «пептид—полярный слой фосфолипидов» соблюдается полярная (заряд—заряд) комплементарность участников, не характерная для специфических взаимодействий пептидных цепей друг с другом.

При исследовании связывания более высокомолекулярных пептидов с липосомами, содержащими фосфатидилглицерин, было показано, что цитохром С и щелочной полипептид гистон Н1 конкурируют за связывание с фосфолипидной мембраной, а полилизин К₁₉ наиболее прочно связывается с кислыми фосфолипидами (Rytomaa, Kinnunen, 1996).

Жидкокристаллическая структура мембраны позволяет индивидуальным фосфолипидам свободно двигаться в слое и выстраиваться в форму, комплементарно соответствующую распределению зарядов регуляторного пептида. Рабочая гипотеза заключается в том, что в некоторых случаях регуляторному пептиду нет необходимости проникать в клетку, так как ему достаточно перестроить и фиксировать комплементарный по зарядам фосфолипидный кластер на поверхности двойного слоя мембраны. А поскольку фосфолипидный состав клеточных мембран разных тканей существенно различается (см. табл. 10), то и структура регуляторного пептида должна быть тканеспецифичной.

Следует отметить, что независимо от механизма воздействия лиганда на мембрану связывание пептидов с рецепторами или с группами фосфолипидов, вызывающее изменение свойств мембраны, описывается одинаковыми уравнениями. Простейший случай взаимосвязи концентрации пептида (C) и отклика системы на полученный сигнал (R) можно представить кооперативной изотермой:

$$R = \frac{R_{\max}}{\left[1 + \left(\frac{K}{C} \right)^n \right]},$$

где $R_{\max}$ — максимальный отклик, соответствующий насыщению рецептора; K — константа связывания; n — параметр кооперативности.

При таком подходе клеточные рецепторы до некоторой степени уподобляются ферментам, а лиганды — субстратам, поскольку их соединение влечет за собой определенную реакцию, т. е. отклик (Волькенштейн, 1981). Для случая, когда кооперативность отсутствует, т. е. $n = 1$, и взаимодействие лиганда осуществляется с единичными рецепторами, это уравнение идентично уравнению Михаэлиса—Ментен для ферментной кинетики. В случае положительной кооперативности взаимодействия ($n > 1$) результирующий отклик системы на сигнал возрастает. Принято считать, что это происходит из-за взаимодействия мембранных рецепторов друг с другом. Примером могут служить высокочувствительные хеморецепторы ракообразных, различающие запахи аминокислот и пептидов (Belli, Rechnitz, 1989). Эти рецепторы расположены на окончаниях дендритов нервных клеток. Чувствительность хеморецепторов голубого краба к запаху аминокислот обнаруживается при концентрации 10^{-15} М и определяет дальнейшее поведение краба. Предполагается, что после взаимодействия хотя бы одного рецептора с единичным лигандом кооперативный отклик всех рецепторов вызывает локальную деполяризацию мембраны нервной клетки и соответствующий потенциал действия. Чувствительность мембранного рецептора к изменению состояния соседа определяется интегрирующими свойствами бислоевой липидной мембраны, в которой располагаются гидрофобные части рецепторов; при этом значения показателя степени n могут достигать нескольких единиц.

Рецепторы некоторых сенсорных клеток, которые располагаются в эпителии сенсорного органа, функционируют на границе с внешней, в частности с воздушной, средой (например, обонятельные клетки, волосковые клетки слухового аппарата). Они имеют значительно более сложное строение, чем хеморецепторы, функционирующие в гуморальной среде. Собственно рецепторные клетки всегда ориентированы по нормали к внешней границе органа. Они окружены поддерживающими клетками, и в их апикальной части расположены специальные мембранные структуры — реснички и ворсинки. Например, на обонятельных нейронах расположено 6—8 модифицированных ресничек, и предполагается, что на их кончиках имеются хеморецепторы запахов.

Однако особенность восприятия запаха состоит в его векторном характере, т. е. воспринимается направление источника сигнала. По-видимому, определенную роль в этом играет морфология клеточных мембран в апикальной части

сенсорной клетки. Реснички, микроворсинки и волоски на окончаниях обонятельных, вкусовых и вестибулярных сенсорных клеток напоминают антенную решетку из вибраторов и щелей (Начала физиологии, 2001). Известно, что разность фаз колебаний, возбуждаемых в одинаковых, но объединенных определенным образом элементах, обеспечивает восприятие сигнала в виде направленного луча. Кроме того, дополнительный эффект пространственной ориентации происходит из-за взаимодействия колебаний двух разных типов на границе разделе двух сред: воздушной и значительно более плотной среды сенсорного органа. Механические колебания, в частности звуковые, распространяются в газовой фазе как продольные волны, а в жидкости — как поперечные. В результате их взаимодействия на границе сенсорного органа могут возникать механические толчки и биения (Иваницкий, Деев, 2001). Реснички на волосковых клетках внутреннего уха воспринимают не только звуковую частоту, но и эти биения, которые вынуждают их поворачиваться в сторону источника звука. Изменение ориентации ресничек немедленно воспринимается нейроном, который передает электрический сигнал исполнительному органу. Электрофизические свойства клеточной мембраны позволяют ей транслировать локальное и даже точечное изменение своего потенциала через жидкокристаллическую структуру липидов с высокой скоростью и со значительным усилением. Это возможно при условии, что периодическое изменение емкости липидного бислоя (ведущий параметр) соизмеримо с частотой возбуждающего сигнала (Рабинович, Трубецков, 1984).

По-видимому, из-за сложного строения сенсорных рецепторов многие сенсорные клетки не способны делиться: их дегенерация или разрушение восполняются за счет стволовых клеток (расположенных вблизи сенсорных клеток), которые при необходимости развиваются как новая сенсорная клетка (Alberts et al., 1994).

Можно предполагать, что таким образом сенсорные органы осуществляют клеточную адаптацию. Если внешняя среда является источником слишком сильного раздражения, разрушающего клеточные рецепторы, то из стволовых клеток сенсорного органа развиваются новые сенсорные клетки, рецепторы которых сохраняют чувствительность к малым изменениям раздражающего фактора на фоне постоянного высокого уровня внешнего раздражения (Richardson, 1993).

Для большинства дифференцированных тканей, клетки которых способны делиться, обновление рецепторов происходит не только при делении клетки, но и в процессах внутриклеточной рециркуляции хеморецепторов в составе везикул. При этом клетка, адаптированная к высоким концентрациям определенного лиганда, может формировать хеморецепторы с повышенной чувствительностью к очень малым изменениям этих высоких концентраций.

Таким образом, эффекты ультрамалых доз отнюдь не являются парадоксальными в кооперативных системах. В традиционной фармакологии эти закономерности описываются функцией насыщения «доза—отклик». Однако биохимическая интерпретация такой зависимости в области ультрамалых концентраций требует определенной осторожности, так как концентрация рецепторов, взаимодействующих с лигандом, не учитывается в уравнении, приведенном на с. 130. Традиционно предполагается, что концентрация рецепторов значительно меньше концентрации специфических лигандов и соответственно реакцию можно описать уравнением первого порядка. В тех системах, где концентрация или активность лигандов может быть измерена независимым биохимическим и одновременно биологическим методами, линейной корреляции между ними, как правило, не наблюдается. В частности, при сравнении активности нейраминидазы по гидролизу олигомерного субстрата с ее активностью по гидролизу рецепторов эритроцитов между ними наблюдается нелинейная зависимость. В этом случае, как и в реакции гемагглютинации эритроцитов вирусами гриппа и при многих других биологических взаимодействиях, измеряемых на определенном отрезке времени, титр реакции (отклик) связан с аналитической концентрацией реагента логарифмическим законом (Шатаева и др., 1978). Это свидетельствует о том, что реакции, возбуждаемые реагентом при воздействии на клетку, могут иметь не кооперативный, а каскадный (цепной) характер.

Латеральная подвижность фосфолипидных элементов плазматической мембраны и их чувствительность к распределению положительно заряженных групп в окружающей среде предопределяют их уязвимость для внешней молекулярной агрессии. Большинство пептидных антибиотиков и токсинов используют именно эти механизмы для нарушения клеточной проницаемости. В частности, стрептолизин О (пептидный токсин) при пикомолярных концентрациях присоединяется к холестерину плазматической мембраны и обра-

зует кольцевую структуру (пору) с диаметром 30 нм (Palmer et al., 1998). Этот процесс завершается истечением содержимого клетки наружу и ее гибелью. Аналогично действуют пептиды-антибиотики дефенсины и протегрины, содержащие в структуре избыток лизина и аргинина (Кокряков, 1999).

Активность пептидных антибиотиков определенным образом зависит от компонентного состава цитоплазматической мембраны и от трансмембранного электрического потенциала клетки-мишени. В составе бактериальных мембран присутствует большое количество кислых фосфолипидов (фосфатидилглицерола и кардиолипина), которые практически отсутствуют в мембранах эукариотических клеток. Эти фосфолипиды являются не только маркерами, но и центрами связывания пептидных антибиотиков животного происхождения, в частности дефенсинов и протегринов, за счет сильных ион-ионных связей, которые устанавливаются по кооперативному механизму аналогично концентрационной зависимости, представленной на рис. 10, А. Кроме того, известно, что мембранный потенциал бактерий в 1.5—2 раза выше, чем у мембран эукариотических клеток. Так что пептидные антибиотики с высоким содержанием лизина и аргинина могут проникать в клетку через мембрану путем электрофореза, подобно тому как это описано для микробных антибиотиков полимиксина В и грамицидинов (Франклин, Сноу, 1984).

Интересно отметить, что ряд протегринов и цекропинов имеют вблизи N-конца триптофан: KW, RW, GW, SW, KW, RRW. В то же время обнаружено, что присоединенный к липосоме пептид определенной структуры, состоящий из 11 аминокислотных остатков и с остатком триптофана на N-конце, может «протащить» липосому в цитоплазму по механизму слияния мембран. Аналогично организован механизм проникновения в клетку вирусной частицы (Pecheur et al., 1998).

Таким образом, взаимодействие пептидов разных классов с цитоплазматической мембраной осуществляется по нескольким механизмам и обеспечивает различные функции клетки, но при этом обнаруживается ряд общих структурных закономерностей. В соответствии со своим строением регуляторные пептиды могут проявлять многообразную активность:

- 1) непосредственно воздействовать на клеточный рецептор, устанавливая межмолекулярные связи с участками пептидной цепи рецептора, которая в результате активизируется,

меняет конформацию и транслирует сигнал о состоявшейся связи в плазматическое пространство;

2) воздействовать на бислойные структуры мембраны, устанавливая ион-ионные связи с полярными головками фосфолипидов, меняя при этом их взаимное расположение, поляризацию и мембранный потенциал, что является сигналом для внутриклеточных мессенджеров;

3) внедряться в структуру липидного бислоя с помощью ароматических и щелочных аминокислотных остатков вблизи N-конца, изменяя проницаемость мембраны по отношению к ионам и растворителю и нарушая целостность мембраны;

4) активировать мембранные ферменты — гидролазы и трансферазы, меняющие соотношение положительных и отрицательных зарядов на поверхности клеточной мембраны, и инициировать таким образом каскад химических и электрохимических трансмембранных реакций;

5) играть роль агонистов (действовать синергетически) при активации мембранных белков (ферментов и рецепторов) другими веществами-метаболитами; не исключено, что тканеспецифическое действие регуляторных пептидов класса цитомединов определяется именно их ролью агонистов при модуляции специфических функций дифференцированных тканей.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДОВ С ХРОМАТИНОМ КЛЕТОЧНОГО ЯДРА

3.1. Компонентный состав и строение хроматина

Ядро эукариотической клетки — самая крупная внутриклеточная структура. Содержимое ядра заключено в ядерную оболочку, состоящую из двух липидных бислойных мембран — внутренней и внешней. Расстояние между ними составляет 20—30 нм, это так называемое перинуклеарное пространство. В ядерной оболочке имеются фиксированные сквозные поры (нуклеопоры), которые соединяют внутреннее пространство ядра с цитоплазмой. В области нуклеопор внешняя и внутренняя бислойные мембраны ядерной оболочки соединяются. Стенки нуклеопор организованы особыми полипептидами — нуклеопоринами. Диаметр нуклеопор составляет 50—80 нм, их площадь занимает приблизительно 10 % всей поверхности ядерной оболочки (Кагава, 1985). Через эти поры в ядро входят белки и выходят рибонуклеопротеиновые комплексы. Собственно рибонуклеиновая кислота самостоятельно не покидает ядро.

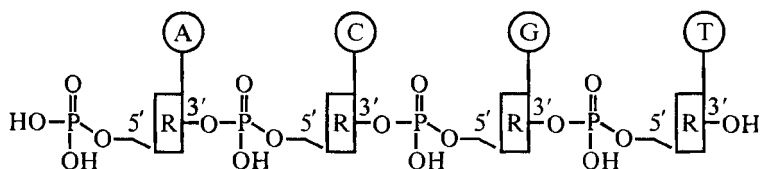
Внутренняя поверхность ядерной мембраны выстлана волокнистым слоем белка ламина, в котором различается упорядоченная решетка микротрубочек, соединяющих нуклеоплазму с внутренней ядерной мембраной.

Внутреннее пространство клеточного ядра заполнено хроматином — сетью двойных спиральных цепей дезоксирибонуклеиновой кислоты, с которой ассоциированы ядерные белки, управляющие основными процессами в клеточном ядре: репликацией ДНК, репарацией ее поврежденных участков и транскрипцией генетической информации с ДНК на матричную РНК. Весовое соотношение ядерных белков и ДНК в хроматине приблизительно 1 : 1.

Главный компонент хроматина — высокомолекулярная ДНК — жесткоцепная макромолекула полиамфолитного ти-

па, мономерные звенья которой соединены фосфодиэфирными связями. ДНК хроматина характеризуется молекулярной массой в диапазоне от 20 кДа до 40 ГДа. Синтез ДНК (репликация) проходит в результате присоединения 5'-фосфатной группы нуклеотида к 3'-гидроксильной группе предыдущего дезоксирибонуклеотида. Таким образом, цепь ДНК, если она не кольцевая, имеет векторную ориентацию от 5'-конца к 3'-концу (последовательность оснований так и записывается); на 5'-конце расположена группа —PO(ОН)_2 , на 3'-конце — гидроксильная группа.

Строение цепи ДНК может быть представлено следующей схемой:



где R — остатки дезоксирибозы, а A, C, G и T — нуклеиновые основания аденин, цитозин, гуанидин и тимин соответственно (Зенгер, 1987).

В двойных спиралях ДНК каждого вида организмов сохраняется последовательность комплементарных друг другу пар оснований А—Т и G—C, так что одна цепь, называемая кодирующей (смысловой), фиксируется встречной, не кодирующей цепью. При этом две цепи ДНК при образовании правой двойной спирали имеют взаимно противоположную ориентацию (Van Holde, 1988).

В начале 50-х годов, т. е. на ранних этапах изучения двойной спирали ДНК, предполагали, что ее геометрическая структура регулярна и соседние нуклеотидные пары повернуты друг относительно друга на 36° , т. е. на один полный оборот спирали приходится 10 пар оснований. Более точная кристаллография ДНК с определенной последовательностью оснований показала, что каждая последовательность имеет характерную нерегулярность — наклоны пар оснований друг относительно друга непостоянны, а это приводит к локальным изгибам спирали. Один оборот двойной спирали ДНК имеет длину приблизительно 3.4 нм. Это усредненные величины для гетерогенной смеси ДНК. Вообще говоря, двойную спираль ДНК не следует рассматривать как однородный стержень. В ее структуре наблюдаются систематические, зависящие от нуклеотидной последовательности

модуляции, которые важны при нуклеиново-пептидном узнавании (см. раздел 3.2). При этом узнавании может происходить изменение вторичной спиральной структуры ДНК с образованием петель, крестообразных структур и узлов (Arnott et al., 1983).

Фосфорилированная углеводная часть ДНК выполняет структурные функции и обеспечивает конформационные перестройки макромолекулы, тогда как линейная последовательность пуриновых и пиримидиновых оснований вдоль цепи ДНК содержит и сохраняет определенную генетическую информацию. На поверхности двойной спирали ДНК различают большую и малую канавки, которые расположены вдоль макромолекулы между двумя цепями ее фосфэфирных связей.

В ряде случаев возможны случайная химическая модификация нуклеотидных оснований или их выщепление из цепи ДНК. В частности, наиболее уязвимы для случайной модификации звенья цитозина. На рис. 11 представлены примеры спонтанного гидролиза цитозина и его модификации под действием ДНК-метилтрансферазы. Более того, от протонирования цитозина зависит образование ряда неканонических структур ДНК (Н-формы), которым приписывают определенную роль в регуляции функционирования генома. Было показано, что на этот процесс влияет существование локальной области более низкого рН в непосредственной близости от цепи ДНК при физиологических условиях (Иванова и др., 1998).

Для защиты генетической информации от случайных повреждений в хроматине функционирует система ферментов, восстанавливающих последовательность оснований поврежденной цепи ДНК в соответствии с последовательностью комплементарной (неповрежденной) цепи.

Из-за отсутствия 2'-гидроксильной группы у дезоксирибозы фосфодифирная связь ДНК значительно более устойчива к щелочному гидролизу, чем аналогичные связи в рибонуклеиновых кислотах. Меньшая устойчивость цепей РНК сочетается с более высокой регуляторной активностью ее мономеров. Аденозин (аденин рибозид) и гуанозин (гуанин рибозид) являются регуляторными молекулами и широко распространены в клетках всех типов. Аденозин — мощный регулятор передачи физиологических сигналов в центральной и периферической нервной системе, клетки которых содержат специфический рецептор. Он может ингибировать или стимулировать высвобождение

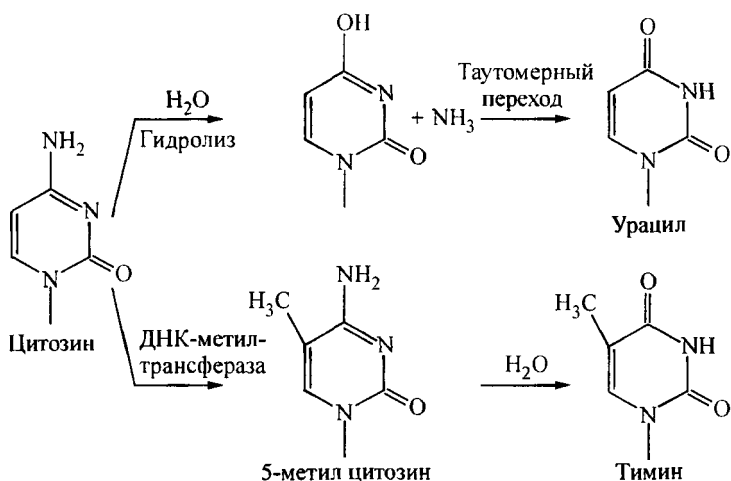


Рис. 11. Возможные природные модификации цитозина.

нескольких нейротрансмиттеров, включая ацетилхолин и катехоламины.

Как известно, одна аминокислота кодируется последовательностью в цепи трех нуклеотидных остатков — кодоном. Однако это кодирование вырожденное, так как большинство аминокислотных остатков определяется более чем одним кодоном. Передача этой информации исполнительным рибосомальным структурам и преобразование ее в форму аминокислотной последовательности осуществляются поэтапно. Путем транскрипции последовательность нуклеотидов с не кодирующей цепи ДНК копируется на мРНК, которая становится в соответствии с комплементарностью оснований копией смысловой последовательности кодирующей цепи ДНК.

Трансляция этой информации (перевод последовательности нуклеотидов с мРНК в последовательность аминокислотных остатков пептидной цепи) происходит на рибосомах в процессе пептидного синтеза. Таким образом, все полипептиды, синтезируемые в клетке, содержат в преобразованном виде генетическую информацию, накопленную и сохраненную предыдущими поколениями организмов. Эта информация является программой, определяющей свойства и функции данного организма, в том числе механизмы его саморегуляции.

Два базовых конформационных состояния ДНК различимы даже при оптическом микроскопировании: это упо-

рядоченные хромосомы и диспергированная сеть хроматина. Хромосомная конформация и упаковка ДНК возникают на этапе деления клетки и обеспечивают репликацию ДНК. Состояние диспергированного хроматина характерно для интерфазы дифференцированной клетки, во время которой осуществляются репарация поврежденных участков ДНК и транскрипция генетической информации.

В настоящее время строение ДНК, генетический код и механизм рибосомального синтеза пептидов детально изучены. Следует только дополнительно подчеркнуть роль межцепной и межмолекулярной комплементарности нуклеиновых кислот, которая обеспечивает точную передачу молекулярной информации и имеет фундаментальное значение для репродукции живых систем.

Рассмотрим особенности химического строения ДНК, которые обеспечивают диапазон ее межмолекулярных взаимодействий с низкомолекулярными метаболитами. Макромолекула ДНК представляет собой полиэлектrolит, сильно и неравномерно гидратированный. Аминогруппы нуклеиновых оснований являются хорошими акцепторами протонов и при установлении водородной связи в кислой области приобретают положительный заряд. Гидроксильные группы фосфата имеют pK_a ниже 2.0 и в физиологических условиях всегда отрицательно заряжены. Гидратация нуклеиновой кислоты играет важную роль в конформационной организации ДНК (А, В и С конформации) и в структуре растворителя вблизи поверхности макромолекулы, особенно со стороны ее большого желобка. В соответствии со своей амфолитной природой ДНК взаимодействует с ионами электролитов, так что при увеличении ионной силы раствора наблюдаются изменения как молекулярного объема и степени гидратации ДНК, так и спирализации (степени закрученности) ее цепей. Важное регуляторное значение имеет локальное взаимодействие ДНК с поливалентными или комплексообразующими металлами. Щелочноземельные и переходные металлы взаимодействуют с кетогруппами пиримидиновых оснований, комплексы платины способны образовывать внутримолекулярные сшивки с локальным нарушением двухспиральной структуры ДНК, кальций и магний взаимодействуют с гидроксильными группами фосфата. Все это многообразие взаимодействий лежит в основе нескольких подвижных уровней структурной организации ДНК в хроматине. Комплексообразование ДНК с соединениями платины лежит в основе цитостатической и проти-

воопухолевой активности препаратов на основе Pt (II) (Bloomfield, 1997).

Для нормального функционирования хроматина часть фосфатных групп ДНК всегда должна быть связана с ионами кальция и магния. Оказалось, что эти ионы обеспечивают взаимодействие ДНК с другими классами биологически активных регуляторов — фосфолипидами и кислыми пептидами. Они нейтрализуют взаимное отталкивание отрицательно заряженных групп этих компонентов и фосфатных групп ДНК и служат мостиками для их межмолекулярного связывания. В частности, ДНК в присутствии кальция образует комплексы с фосфатидилхолином, фосфатидилэтаноламином и сфингомиелином (Хусаинова и др., 1999). С одной стороны, ДНК в комплексе с фосфолипидами частично расплетается и становится более доступной для действия эндонуклеазы. С другой стороны, эти комплексы ДНК имеют палочкообразную форму и проявляют выраженную липофильность. Так, они вызывают слияние липосом, т. е. играют роль «фузогена» при взаимодействии с клеточной мембраной и могут транспортировать через липидный бислой фосфолипиды и кислые пептиды (Кувичкин, 2000). В хроматине обнаружены не только липиды, но и их комплексы с белками. Иммунохимическим анализом в активном хроматине гепатоцитов обнаружены аполипопротеины, содержащие белки с молекулярной массой 28 и 14 кДа (Панин и др., 1992).

Определенное регуляторное значение имеет комплексообразование ДНК по механизму интеркаляции, при котором плоские ароматические и полициклические молекулы встраиваются в двойную спираль между соседними парами оснований, что приводит к блокированию процесса транскрипции. Такой механизм лежит в основе связывания ДНК с профлавином, акридином, бромистым этидием и некоторыми другими противоопухолевыми антибиотиками. Однако возможен и другой путь блокирования: выраженные кислотные свойства ДНК обеспечивают ей прочные межмолекулярные взаимодействия с полиаминами и щелочными пептидами. Например, олигопептидный антибиотик нетроксин, содержащий реакционноспособные аминокислотные группы и обладающий антивирусной и противоопухолевой активностью, селективно связывается с А—Т-парами оснований, располагаясь в малой канавке двойной спирали В-конформации ДНК. Рентгеноструктурный анализ обнаружил высокую степень электростатической комплементарности нетроксина с фосфатными группами спиральной ДНК (Wainer et al., 1982).

3.2. Межмолекулярные взаимодействия регуляторных пептидов и ДНК

Взаимодействия между белками и нуклеиновыми кислотами осуществляются на всех этапах репликации и экспрессии ДНК, а также в ходе многочисленных процессов клеточной саморегуляции.

Анализ строения полипептидного каркаса и его боковых групп показал, что существуют четыре потенциально возможных типа взаимодействий между пептидами и нуклеиновыми кислотами (Claud, 1971; Hippel, McGhee, 1972; Nucleic acid-protein recognition, 1977):

1) солевые связи между фосфатными и положительно заряженными боковыми группами аминокислотных остатков (лизина, гуанидиновой группы аргинина и протонированным остатком гистидина);

2) водородные связи между фосфатными группами, нуклеотидами, углеводными частями нуклеиновых кислот, протон-донорными и протон-акцепторными группами пептида;

3) стэкинг-взаимодействия между боковыми группами остатков ароматических аминокислот (триптофана, тирозина, фенилаланина, гистидина) и нуклеотидами по механизму, аналогичному интеркаляции;

4) гидрофобные взаимодействия 5-метил цитозина и тимина с неполярными боковыми группами пептидов.

Энергия представленных четырех типов взаимодействия уменьшается в том порядке, в котором они перечислены. Однако при рассмотрении таких систем необходимо учитывать, что все эти взаимодействия осуществляются в комплексе.

ДНК обладает высокой реакционной способностью взаимодействия с полипептидами и полиаминами. Большое внимание уделено изучению комплексообразования ДНК с протаминами. Эти пептиды располагаются на поверхности двойной спирали так, что положительные заряды соседних боковых групп смотрят в разные стороны и одновременно связываются с фосфатными группами обеих цепей двойной спирали ДНК (Зенгер, 1987). Было показано, что при таких взаимодействиях происходит ассоциация комплексов в надмолекулярные структуры, причем большое значение имеет распределение гидрофобных групп полипептида вдоль цепи. Подробные кристаллографические исследования структуры этих комплексов проводились с целью моделирования взаимодействия ДНК с гистонами.

Гистоны представляют собой эволюционно консервативные одноцепочечные пептиды щелочной природы, содержащие большое количество лизиновых и пролиновых остатков и выполняющие в хроматине структурные функции. ДНК, содержащая около 200 пар оснований, и октамер, состоящий из четырех типов гистонов (H2A, H2B, H3, H4), образуют нуклеосому, которая является структурной единицей хроматина (McGhee, Felsenfeld, 1980). По форме нуклеосомы напоминают диски с диаметром 11 нм и толщиной 5.7 нм, расположенные на цепях ДНК «как птички на проводах». В среднем 146 пар оснований связаны в форме суперспирали блоком из восьми гистоновых молекул (коровая частица) и таким образом защищены от транскрипции. Между нуклеосомами находится 50—150 пар оснований (линкерная ДНК), доступных для транскрипции (Van Holde, 1988).

Все остальные полипептидные и белковые компоненты хроматина обычно называют негистоновыми белками. Их количество достигает 500, включает десятки ферментов, полимеразы, репрессоры, активаторы и 15—20 полипептидов, структура которых недостаточно изучена. Кроме того, из нуклеоплазмы выделены компоненты, участвующие в поддержании пространственной структуры хроматина, белки внутриядерной фибриллярно-гранулярной сети, в том числе актин, тропонин, тубулин, ДНК-релаксирующие белки и нуклеопорины.

Следует отметить большие методические трудности при изучении межмолекулярных взаимодействий ДНК с пептидами. Эти трудности связаны с известной диспропорцией в развитии методов изучения высокоочищенной ДНК и ее комплексов с пептидами. С одной стороны, крупная макромолекула ДНК легко может быть визуализирована, ориентирована в электрическом поле, расположена в желобке на стеклянной поверхности и разрезана в определенной точке нуклеазой. Все эти манипуляции проводятся под контролем атомно-силовой и туннельной микроскопии и напоминают молекулярную хирургию (Yuqiu et al., 1992). С другой стороны, разработка методов отделения полипептидов от ДНК при сохранении их нативности далека от завершения. Как правило, для разделения используют методы экстракции, комплексообразования с полиэтиленимином, фракционного осаждения и переосаждения полипептидов (Burgess, 1991). Пептиды, специфически связанные с ДНК, с большим трудом от нее отделяются и часто при этом быстро теряют свою

специфическую активность. Например, известно, что тканевый гомеостаз регулируется механизмом отрицательной обратной связи с участием кейлонов, которые вырабатываются в зрелых и дифференцированных клетках. Эти тканеспецифические ингибиторы клеточной пролиферации выделяются из препаратов ДНК фракционным спиртовым осаждением (Балаж, Блажек, 1982). Кейлоны, как и цитостатики, могли бы быть использованы в качестве антибластомных средств. Однако полученные препараты высокоочищенных кейлонов нестабильны, что затрудняет не только их медицинское использование, но и изучение в модельных системах (Романов и др., 1984).

В принципе процесс транскрипции может быть инициирован за счет снятия гистоновой блокировки (Dymlacht, 1997). Значительную роль в этом механизме играет убиквитин. Уже давно было замечено, что ядерный белок A24 состоит из двух полипептидов — гистона H2A и убиквитина, которые связаны между собой ковалентной связью (Goldknot et al., 1980). Удаление гистона H2A из нуклеосомы по механизму убиквитинизации (аналогично удалению мембранных рецепторов) и его транспорт к протеосомам являются первым этапом подготовки данного участка ДНК к транскрипции (Boarends, 1999).

Кроме собственно убиквитина в хроматине обнаружено целое семейство убиквитин-подобных регуляторных пептидов, которые контролируют конформацию ДНК на разных этапах транскрипции и, ингибируя топоизомеразу, предотвращают повреждение ДНК (Suzuki et al., 1999; Mao et al., 2000).

В хроматине функционирует также механизм «рецепторного» включения транскрипции. Собственная система рецепторов хроматина представляет собой прочно связанные с ДНК ядерные белки, конформация которых зависит от присутствия специфического лиганда. Их называют лиганд-зависимыми факторами транскрипции. При отсутствии лиганда ядерный рецептор является репрессором. При связывании специфического лиганда этот рецептор меняет свою конформацию и активирует транскрипцию (если нет другого репрессора). Такие ядерные рецепторы обнаружены и исследованы для витамина А, тироксина и стероидных гормонов (Horlein et al., 1995).

Гистоны и негистоновые белки хроматина регулируют клеточный цикл на всех этапах — от деления до завершения существования дифференцированной клетки. Нормальное

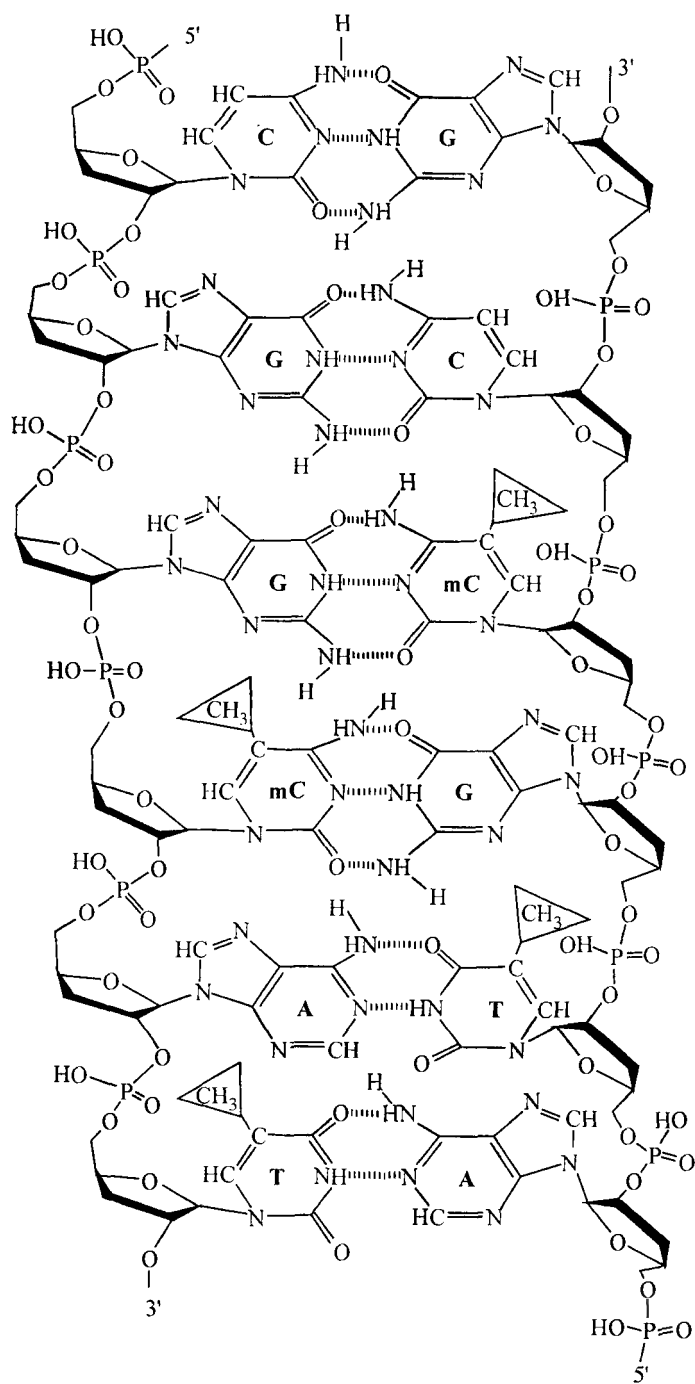
соотношение между делящимися и покоящимися клетками — митотическое равновесие в постоянно функционирующих органах и тканях поддерживается тканеспецифическими факторами транскрипции. В рамках рассматриваемой проблемы саморегуляции мы остановимся только на механизмах пептидной регуляции транскрипции.

Транскрипция каждого гена контролируется его регуляторной областью, расположенной вблизи сайта, с которого начинается транскрипция в направлении от 5'- к 3'-концу. Эта область представляет собой участок двойной спирали ДНК и комплементарно связанные с ним регуляторные пептиды. Иными словами, регуляторные области генов представляют собой нуклеопротеиновые комплексы (НПК). В состав НПК входят белки двух типов: репрессоры (они предотвращают транскрипцию гена) и факторы транскрипции, которые включают транскрипцию (Jacob, Monod, 1961). Эти белки осуществляют контроль за экспрессией генов и синтезом белков, необходимых клетке на данном этапе существования, не расплетая двойной спирали ДНК. Как оказалось, для пептидных факторов транскрипции (ФТ) нет необходимости внедряться во внутренние области двойной спирали, так как на ее внешнюю поверхность экспонированы протон-донорные, протон-акцепторные и гидрофобные группы каждой пары оснований.

При формировании двойной спирали пары оснований G—C и C—G устанавливают три водородные связи внутри двойной спирали, а пары A—T и T—A — только две. В то же время пары G—C и C—G экспонируют на поверхность большой канавки две протон-донорные группы, а пары A—T и T—A — дополнительно гидрофобную CH_3 -группу тимина. Особое значение имеют группы метилированного цитозина (рис. 11). Они присутствуют в повышенной концентрации на участках ДНК, обозначаемых обычно как CpG-островки (CpG-islands) (Antequera, Bird, 1993). Длина этих участков достигает 1000 пар оснований (т. е. длиннее экзонов и короче интронов). Они расположены в регуляторных областях вблизи 5'-конца генов. Эксперименты показали, что метилированная ДНК значительно сильнее связывает пептиды (Bird, 1992). По-видимому, метильная группа 5-метил цитозина (mC) вносит свой вклад в конфигурацию характерного сайта узнавания и в энергию связывания пептидного фактора транскрипции с ДНК.

Как мы увидим дальше, именно метрика расположения водородных связей и гидрофобных групп на поверхности

A



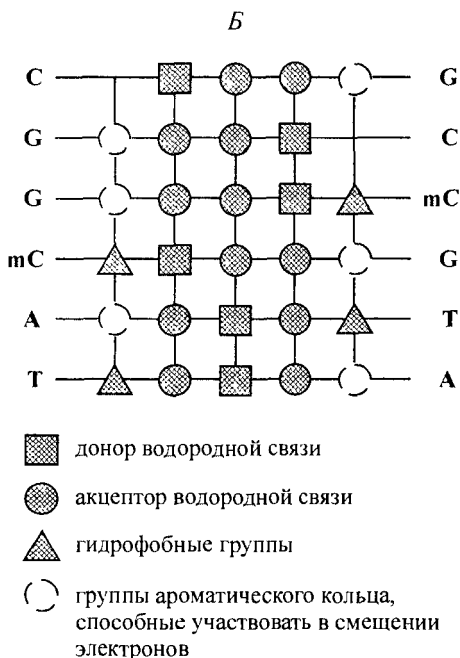


Рис. 12. Взаимное расположение функциональных групп комплементарных нуклеотидов в сечении двойной спирали ДНК (*А*) и комбинация функциональных групп, экспонированных на поверхность вдоль большой канавки двойной спирали последовательности CGGmCAT (*Б*).

большой канавки двойной спирали определяет селективное связывание регуляторных пептидов и ДНК (Alberts et al., 1994).

На рис. 12 представлены схемы объединения А—Т, G—C и G—mC нуклеотидных пар и характерное расположение функциональных групп по поверхности большой канавки двойной спирали для последовательности кодирующей цепи CGGmCAT. Рис. 12, *Б* иллюстрирует тот факт, что каждая последовательность нуклеотидов образует уникальный орнамент (характерное расположение) функциональных групп на поверхности большой канавки двойной спирали. Замечательно то, что на поверхность экспонированы функциональные группы нуклеотидов, принадлежащих как кодирующей, так и не кодирующей цепям ДНК. Расположение этих групп составляет основу для специфического межмолекулярного «узнавания» участка ДНК пептидными ФТ, т. е. регуляторными пептидами хроматина.

В первую очередь регуляторные функции выполняют полипептиды, которые отвечают за локальные изгибы и скручивание цепей ДНК. Они узнают специфические сайты по характерному расположению водородных связей и гидрофобных групп в большой канавке двойной спирали и устанавливают сильные ион-ионные взаимодействия с фосфатными группами ДНК. Все это приводит к большим торсионным напряжениям макромолекулы, в результате чего жесткие участки цепи ДНК могут изгибаться. Именно эти изменения локальной структуры переводят ДНК из состояния репрессии в состояние активации, т. е. готовности к транскрипции (Tang et al., 2000). Последующий этап раскручивания двойной спирали для транскрипции возникает только при взаимодействии ДНК с пептидами, принадлежащими высокоподвижной группе (HMG). Эти полипептиды имеют неоднородную структуру, состоящую из глобулярных доменов и развернутых участков полиглутаминовой и полиаспарагиновой кислот (до 22 аминокислотных остатков). В отличие от более щелочных пептидов они способствуют раскручиванию спирали и расплетанию двухцепочечной ДНК (Van Holde, 1988). По-видимому, в этой системе межмолекулярного взаимодействия решающую роль играет не столько взаимное отталкивание отрицательно заряженных фосфатных групп ДНК и карбоксильных групп полипептидов, сколько установление сильных водородных связей карбоксильных групп пептида с атомами азота нуклеиновых оснований (Luisi et al., 1998).

Исследования структур многочисленных ФТ, функционирующих в хроматине, еще далеки от завершения. Ранее было показано, что специфические сайты связывания пептидных ФТ представляют собой короткие последовательности на спирали ДНК продолжительностью до 20 пар оснований. Это основная деталь генетического «выключателя». Сотни таких последовательностей известны для различных регуляторных белков (Mitchell, Tjian, 1989). Например, участок ДНК, определяющий транскрипцию гена секреторного протеина Sp-1, содержит последовательность GGGCGG. Схема, представленная на рис. 12, Б, позволяет построить для этой последовательности макет расположения функциональных групп на поверхности двойной спирали, а также представить вероятную аминокислотную последовательность пептидного фактора транскрипции, комплементарного такому расположению.

Для существующей в природе высокой специфичности взаимодействия транскрипционных факторов с двойной

спиралью ДНК недостаточно простого комплементарного связывания пептида в большой канавке ДНК. Большое значение имеют конформация и пространственная ориентация сайта связывания, а также соответствие расположения гидрофильных, гидрофобных и донорно-акцепторных областей обеих макромолекул. В экспериментальных исследованиях было показано, что в хроматине существуют белковые факторы, которые вызывают изменение конформации ДНК для последующего связывания регуляторных пептидов с промотерными участками и активации транскрипции генетической информации. Это так называемые архитектурные факторы хроматина (Wolffe, 1994). В связи с тем что взаимодействие пептидов с нуклеиновыми кислотами регулирует состояние ДНК в хроматине и физиологическое состояние клетки, во многих работах было исследовано влияние такого комплексообразования на подвижность комплексов (Katan-Khaykovich, Shaul, 1998), активность ферментов (Bell et al., 1997) и физические характеристики макромолекул, такие как стабильность комплексов и изменение температуры плавления двухспиральной цепи (Cattau et al., 1969; Tanatani et al., 1998).

Наиболее изученные структурные мотивы пептидных факторов транскрипции состоят из геометрических последовательностей «спираль—изгиб—спираль» и «спираль—петля—спираль» (helix—turn—helix), в которых спиральные участки пептидной цепи развернуты друг относительно друга на 120° . Пептидная цепь, как правило, имеет форму правой спирали, даже если она не имеет α -спиральной конформации. При этом предполагается, что часть пептидной цепи, возможно петля, укладывается в большую канавку ДНК (Harrison, 1991). Двойная спираль ДНК также закручена вправо. Поэтому при контакте этих макромолекул их поверхности могут плотно прилегать друг к другу.

Другим структурным вариантом сайта связывания факторов транскрипции является участок цепи с «лейциновой застежкой» (basic leucine zipper), состоящий из двух основных боковых последовательностей, образующих α -спираль, который селективно связывается с нуклеотидным октамером 5'ATTTGCAT3'. Очевидно, что при этом гидрофобные группы лейцина взаимодействуют с гидрофобными группами CH_3 тимидина (Alberts et al., 1994; Leonard et al., 1997).

Известен также тип пептидных структур «узнавания» специфических сайтов ДНК для инициирования транскрипции, состоящий из α -спирали и β -складки, связанных ионом

цинка и сопряженных с последовательностью аминокислотных остатков С—С и Н—Н. Эта структура связывается с последовательностью нуклеотидов GGG, причем в связывании участвуют остатки аргинина и гистидина (Coleman, 1992).

Однако предлагаемые к настоящему времени модели «узнавания» представляют собой вариации соответствий геометрических структур на поверхности контакта «ДНК—пептид». Пока нет четко установленных соответствий между последовательностью нуклеотидов сайта связывания и аминокислотной последовательностью регуляторного пептида — ФТ (Pabo, Saueg, 1992). Можно только предполагать, что модуляция генетической активности клеток под действием олигопептидов группы цитомединов определяется их сайт-специфическим связыванием с промотерными участками ДНК хроматина (Морозов, Хавинсон, 1985).

Кроме пептидов, связанных с промотерными участками ДНК, известны пептиды, которые контролируют посттранскрипционные процессы с участием вновь синтезированной мРНК. Отмечено, что их аминокислотная последовательность содержит многочисленные повторы дипептидного блока КН (до 15 на молекулу), хотя дополнительных исследований для уточнения, какие именно специфические сайты на цепи мРНК отвечают за связывание этих блоков, не проводилось (Adinolfi et al., 1999).

За последнее десятилетие достигнуты определенные успехи в области исследования молекулярных механизмов, определяющих различия между нормальным и патологическим делением клеток. В разных культурах клеток обнаружено семейство факторов деления, которые действуют подобно убиквитину, но при этом контролируют длину теломеров (Tanaka et al., 1999). Теломеры — это концевые структуры ДНК в хромосоме, в основе функционирования которых лежит способность гуанозина образовывать самоассоциаты. Теломеры представляют собой специализированные ДНК-полипептидные комплексы. Они защищают хромосомы от сшивания конец в конец и от действия эндонуклеаз. Некоторые авторы считают, что теломеры могут служить также для узнавания гомологичных хромосом в процессе мейоза. Длина теломеров неодинакова на разных стадиях клеточного цикла и в разных тканях, однако она укорачивается при каждой репликации. Поэтому клетка может делиться только ограниченное число раз. На конце теломеры имеют подвешенный (не спаренный) участок G-обогашен-

ной цепи ДНК. На базе этого «хвостика» с участием теломеразы иницируется синтез второй нити, в результате которого сохраняется длина хромосомы (Ильичева, Флорентьев, 1992). Предполагалось, что теломераза, т. е. ДНК-полимераза, участвующая в образовании теломеров, может значительно продлить жизнь клетки, увеличивая число ее нормальных делений. На культуре ткани было показано, что введенная теломераза обладает способностью поддерживать постоянную длину теломерных участков, в результате чего клетки приобретают способность к неограниченному, но не злокачественному размножению. Однако дополнительные эффекты — неполная репликация теломеров и торможение репарации цепей главной последовательности ДНК — вызывают сомнение в том, что только с помощью одной теломеразы можно решить проблему продолжительности жизни клетки (Егоров, 1999).

Нормальный жизненный цикл клетки после последнего деления завершается апоптозом — организованной деструкцией клетки. Возможен также некроз — патологическое разрушение и разложение элементов клетки под действием внешних факторов — инфекции, отравления, остановки метаболизма или механического повреждения.

Нормальный апоптоз протекает как упорядоченный процесс под контролем генетической программы. Основным регулятором апоптоза у млекопитающих является ген *bcl-2*, активная экспрессия которого тормозит развитие апоптоза (Хавинсон, Кветной, 2000). Апоптотический процесс начинается в клеточном ядре с характерной конденсацией и фрагментации хроматина с последующей фрагментацией ядерной мембраны, так что каждый фрагмент хроматина оказывается упакованным в мембранную оболочку. На протяжении этой фазы плазматическая мембрана не повреждена и в цитоплазме изменений не наблюдается. Затем начинается сегрегация цитоплазмы и внутриклеточных органелл, так что их части оказываются заключенными в мембранные везикулы, и клетка исчезает. Такое саморазрушение не сопровождается выделением токсинов и экономит цитоплазматический материал для дальнейшего использования. Повидимому, оставшиеся от клетки везикулы могут быть поглощены по механизму эндоцитоза популяцией окружающих клеток, в том числе дочерних (Re et al., 1994). В этой последовательности событий заключается принципиальное отличие апоптоза от некроза, при котором компоненты мембраны, ядра и цитоплазмы подвергаются глубокому гидро-

лизу, а освобожденные из лизосом ферменты токсически действуют на окружение гибнущей клетки, так что все продукты некроза должны быть удалены из организма (Куций и др., 1999). При некрозе возможна не только гибель клетки, но и гибель целого органа или организма. Возрастная инволюция ключевых органов и тканей приводит к нарушению контроля за физиологической гибелью клеток и, как следствие, увеличивается число некротизированных клеток (Хавинсон, Кветной, 2000). В настоящее время оценка количества клеток, входящих в апоптоз, является значимой в медицинской практике при клинко-иммунологическом обследовании (Ярилин и др., 2000).

3.3. Модельные и природные нуклеопротеиновые комплексы

Помимо того что молекула ДНК представляет собой способ хранения генетической информации, она, как было показано в разделах 3.1 и 3.2, является макромолекулой с особыми физико-химическими характеристиками и обладает уникальными регуляторными свойствами. В частности, известно, что в клетках и тканях ДНК способна проходить через клеточную и ядерную мембраны (Simon, 1992). После этого макромолекула может быть расщеплена специфическими нуклеазами, а ее фрагменты способны принять участие в регуляции некоторых процессов клеточного цикла. Например, биологическая активность фрагментов ДНК была использована при создании иммуномодулятора Деринат, который представляет собой 1.5%-ный раствор высокоочищенной натриевой соли нативной ДНК (дезоксирибонуклеат натрия) из молок осетровых рыб, деполимеризованной ультразвуком и растворенной в 0.1%-ном водном растворе хлорида натрия (Урсова, 2000).

Повышение способности биоактивных макромолекул проникать сквозь клеточные мембраны составляет одну из важных задач современной биотехнологии и медицины. Трудности, связанные с преодолением мембранного барьера клеток, ограничивают возможности направленного транспорта лекарств, генетической трансформации клеток, регуляции внутриклеточных процессов экзогенными белковыми факторами (Марьянович, Поляков, 1991). Одним из подходов к преодолению подобных трудностей является комплексобразование биологически активных веществ с полимера-

ми, которое препятствует деградации белковых факторов гидролитическими ферментами либо придает им недостающие свойства для проникновения в клетку. Нуклеиновые кислоты удовлетворяют всем требованиям, необходимым для полимеров-носителей, и в первую очередь обладают биосовместимостью (Панарин, 1989). При образовании интерполиэлектролитных комплексов (ИПЭК) нуклеиновых кислот с линейными синтетическими поликатионами происходит кооперативное связывание электростатически комплементарных цепей, сопровождающееся экранированием заряда фосфатных групп нуклеиновой кислоты, которое приводит к формированию гидрофобного участка в макромолекуле. Число и протяженность таких участков задаются степенью полимеризации блокирующего поликатиона и составом поликомплекса. Для проявления биологической активности нуклеиновой кислоты необходимо ее специфическое узнавание белками-регуляторами и ферментами. Далеко не всегда образование ИПЭК приводит к потере возможности такого распознавания. Например, проведенные исследования показали, что поли-N-этил-4-винил-пиридиний бромид, связанный с ДНК, не препятствует ее специфическому узнаванию. Поликатион перемещается по цепи ДНК с одних участков на другие, открывая места для рестрикции. Эксперименты по оценке эффективности трансформации указывают на перспективность применения таких комплексов для генной инженерии (Кабанов и др., 1989).

В то же время чужеродная ДНК может встраиваться в геном других клеток и изменять набор продуктов эндогенного белкового синтеза. В ряде работ (Кабанов, Кабанов, 1994; Дебабов, 1997) определены перспективы использования этого свойства для ДНК-вакцинации и генотерапии, а также для доставки генетического материала в клетку. Однако до настоящего времени в полной мере не исследованы свойства ДНК как поверхностно-активного вещества. Эти исследования могли бы прояснить механизмы проникновения макромолекул таких размеров через цитоплазматическую мембрану и обосновать с точки зрения коллоидной химии возможность введения экзогенной информации в геном клетки.

Для направленной доставки чужеродного генетического материала в клетку без повреждения ее мембраны было предложено использовать ИПЭК инсулин-поли-L-лизин-ДНК (Розенкранц и др., 1990). Инсулин является лигандом, который специфически узнает рецептор на поверхности клет-

ки, а поли-L-лизин обеспечивает его нековалентную связь с ДНК. Такой конъюгат обеспечивает селективную и целенаправленную доставку чужеродного генетического материала в клетки млекопитающих и растений посредством рецептор-опосредованной интернализации (эндоцитоза). Была также доказана эффективность этого метода трансфекции и показана целесообразность его применения *in vivo*.

Изучение селективности связывания ДНК с модельными неспецифическими белками, которые различаются кислотно-основными свойствами и не являются типичными компонентами клеточного ядра, представляет интерес для понимания свойств ДНК как полимера-носителя, на базе которого формируются нуклеопротеиновые комплексы с различными физиологическими свойствами. Нами было проведено изучение количественных закономерностей и механизмов образования подобных комплексов в модельных системах (Ряднова и др., 2000а); были исследованы закономерности связывания ДНК из селезенки крупного рогатого скота с глобулярными белками, которые различаются кислотно-основными свойствами: пепсином ($pK = 2.0$), инсулином ($pK = 5.4$), кортексином ($pK = 9.5$), цитохромом С ($pK = 10.6$) и протамином ($pK = 11.5$). В физиологических условиях суммарный заряд этих белков варьировал от 36^- для пепсина до $(30-32)^+$ для протамин. Несмотря на то что ДНК несет отрицательный суммарный заряд на своей поверхности, в интервале ионной силы от 0.1 до 0.5 н наблюдается образование устойчивых нуклеопротеиновых комплексов ДНК со всеми исследованными белками. Причем при комплексообразовании не происходит «расплетания» двухцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты, о чем бы свидетельствовал гиперхромный эффект — резкое увеличение поглощения в УФ-области при длине волны 260 нм. На рис. 13 представлена хроматография и рехроматография комплекса ДНК—инсулин на сефадексе G-150 при ионных силах раствора 0.3 и 0.5 н. На хроматограмме регистрируются два пика. Первый пик выходит с объемом задержки колонки, второй пик — с объемом, значительно превышающим объем задержки свободного белка, не связанного в комплекс. На рехроматограмме (рис. 13, Б) высокомолекулярной фракции обнаруживается только пик нуклеопротеинового комплекса, что свидетельствует о его устойчивости даже при повышенной ионной силе раствора (Шатаева и др., 1999).

Во всех исследованных системах процесс комплексообразования проходил по кооперативному механизму, но в

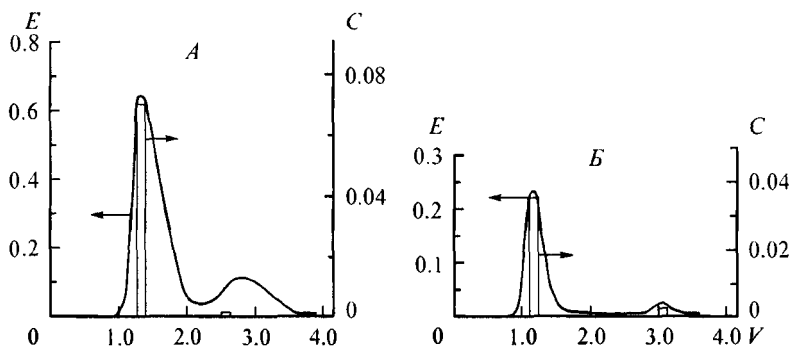


Рис. 13. Гель-хроматография комплекса ДНК—инсулин (Sephadex G-150). *A* — гель-хроматография исходного раствора, ионная сила 0.3 н; *B* — рехроматография первого пика хроматограммы комплекса ДНК—инсулин, ионная сила 0.5 н. E — оптическая плотность при длине волны 260 нм; V — относительный объем выхода; C — концентрация белка (мг/мл).

каждом случае стехиометрия и прочность связывания ДНК с белками зависели от концентрационного соотношения компонентов в комплексе и от природы белка (Ряднова и др., 2000а).

Как уже отмечалось, нуклеиновые кислоты очень перспективны для использования в качестве полимерных носителей биологически активных веществ с целью защиты последних от ферментативного гидролиза и облегчения их доставки к органу- или клетке-мишени. Нами была исследована устойчивость комплексов ДНК с инсулином, пепсином и кортексином к гидролизу ДНКазой и трипсином. Оказалось, что эти ферменты не разрушают комплексы и не гидролизуют белок, связанный в комплекс. Это, безусловно, свидетельствует о перспективности применения комплексов ДНК с белками и пептидами для создания пероральных лекарственных форм препаратов, обладающих регуляторными функциями.

Известно, что конформация ДНК является важным фактором как для реализации генетической программы клетки, так и для проникновения экзогенной ДНК в ядро. В ряде работ было показано, что при взаимодействии ДНК с щелочными белками класса гистонов происходит компактизация макромолекулы, степень которой зависит от весового соотношения ДНК/гистон (Мартынкина и др., 1991, 1998). Нами также было показано, что процесс комплексообразования ДНК зависит от исходного количественного соотношения компонентов в растворе и определяет степень (плот-

ность) заполнения молекулы ДНК белком. В свою очередь степень заполнения определяет морфологию образующихся нуклеопротеиновых комплексов (НПК). На рис. 14 представлены изменения характеристической вязкости растворов ДНК от плотности заполнения жесткоцепной макромолекулы ДНК глобулярными молекулами белка. Очевидно, что при увеличении плотности заполнения ДНК белком характеристическая вязкость растворов НПК уменьшается. Предельные значения характеристической вязкости НПК при максимальном заполнении ДНК глобулярными белками очень близки для всех исследованных систем. Однако процессы компактизации ДНК при ее постепенном заполнении белками, различающимися кислотнo-основными свойствами, идут по-разному. В частности, при взаимодействии ДНК с инсулином происходит постепенное уплотнение структуры комплекса, затем образование конфигурации «ожерелье», аналогичной обнаруженной при взаимодействии ДНК с гистонами (Киселева и др., 1998). По-видимому, именно компактизация структуры комплекса ДНК—инсулин обеспечивает его устойчивость при увеличении ионной силы раствора и действии гидролитических ферментов. В связи с тем что получение новых лекарственных форм инсулина является насущной проблемой эндокринологии (Власов и др., 1988; Валуев и др., 1998), представляется целесообразным продолжение исследований комплексов ДНК—инсулин и изучение биологической активности инсулина, включенного в НПК.

При связывании ДНК с цитохромом С процесс компактизации протекает намного интенсивнее. Уже при низких концентрациях белка образуются нелинейные структуры типа «ожерелье», так как щелочная природа боковых групп цитохрома С облегчает его локальные многоточечные взаимодействия с фосфатными группами ДНК. Поэтому при взаимодействии ДНК с цитохромом С не возникает надмолекулярных структур НПК.

В случае образования комплекса ДНК с пепсином (самым кислым из всех исследованных белков) снижение характеристической вязкости НПК наблюдается уже при невысоком содержании белка в системе. Очевидно, что вопрос о механизме образования комплексов ДНК с кислыми белками требует дальнейших исследований и расширения методических подходов, так как именно кислые регуляторные белковые факторы хроматина участвуют в расплетании двойной спирали ДНК (Ряднова и др., 2000а).

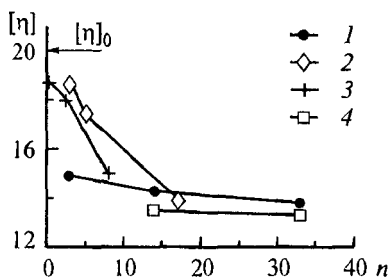


Рис. 14. Зависимость характеристической вязкости ДНК $[\eta]$ (дл/г) и ее комплексов от количества связанного белка.

$[\eta]_0$ — свободная ДНК; нуклеопротеиновые комплексы: 1 — ДНК—цитохром С, 2 — ДНК—инсулин, 3 — ДНК—пепсин, 4 — ДНК—кортексин. n — среднее количество молекул белка, связанных с молекулой ДНК.

Исследование концентрационных закономерностей формирования модельных комплексов ДНК с белками и оценка их устойчивости в физиологических условиях позволяют экстраполировать эти закономерности на природные НПК, выделенные из разных тканей. Применение модельных или природных НПК в медицинских целях для коррекции функций поврежденных или стареющих тканей облегчается из-за высокой устойчивости этих препаратов к действию гидролитических ферментов желудочно-кишечного тракта.

Перспективность проведенных в этом направлении исследований подтверждается эффективностью природных НПК, выделенных из различных органов и тканей, — цитаминнов, применяемых в медицинской практике для коррекции физиологических нарушений отдельных функций организма, в частности при ослаблении иммунитета и памяти в результате стресса и физических нагрузок (Морозов и др., 2000а; Хавинсон и др., 2001г).

Технологический прием, положенный в основу получения природных нуклеопротеиновых комплексов, состоит в том, чтобы в условиях мягкого щелочного гидролиза клетки сохранить структурные элементы хроматина, в которых эндогенные регуляторные пептиды естественно объединены и связаны с соответствующими специфическими участками ДНК. Одновременно на стадии экстракции протекает частичный гидролиз линкерных участков ДНК сопутствующими эндогенными ДНКазам. Продукты такого гидролиза (олигомеры) отделяются на стадии осаждения НПК.

Присутствие гликолипидных и фосфолипидных компонентов мембран в препаратах, полученных на первом этапе выделения, затрудняет растворимость комплексов. Делипи-

дизация препаратов с помощью хлороформа, который является универсальным растворителем для всех классов липидов (лецитинов, цефалинов и сфингомиелинов), увеличивает растворимость НПК и улучшает качество хроматографического анализа состава этих комплексов (Препаративная биохимия липидов, 1981).

В зависимости от типа ткани, из которой выделены НПК, составы препаратов различаются соотношением белков и липидов. Содержание нуклеиновых кислот практически одинаково во всех препаратах, поскольку клетки всех дифференцированных тканей организма содержат одинаковый набор хромосомных нуклеиновых кислот.

Для оценки устойчивости полученных природных препаратов НПК по отношению к ферментативному гидролизу в желудочно-кишечном тракте использовали энзиматическую обработку этих комплексов. Как и в случае модельных НПК, после ферментативной обработки природных НПК в их высокомолекулярной фракции сохраняются полипептиды, прочно связанные с ДНК. Это является косвенным подтверждением того факта, что подобранные условия разрушения клетки и клеточного ядра на стадии получения препаратов НПК позволяют сохранить устойчивые элементы структур хроматина. Методами хроматографического анализа в препаратах НПК головного мозга обнаружены белки с молекулярными массами в области 20—24 кДа, которые, по-видимому, могут быть идентифицированы как кислые белки группы BASP, локализованные в синаптической области нейронов (Mosevitsky et al., 1994). Кроме того, во всех природных препаратах НПК содержатся низкомолекулярные пептиды — аналоги цитомединов (Кузник и др., 1995).

Проведенные физико-химические исследования послужили основанием для использования природных НПК в качестве пероральных лекарственных форм и пищевых добавок (Ряднова и др., 20006).

ПЕПТИДНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ СТАРЕНИЯ

Феномен старения и смерти живого организма предопределен биологически и обеспечивает общее эволюционное развитие живой природы. В соответствии с законом естественного отбора в ходе эволюции не только расширяются метаболические (трофические) связи живых систем с окружающей средой, но и увеличивается информационное содержание этих связей. Информационное обеспечение в свою очередь повышает надежность функционирования каждого живого организма и его соответствие окружающей среде на данном этапе эволюции (Шмальгаузен, 1961). Таким образом, изменчивость, вариабельность, накопление новых биологических свойств позволяют живым системам приспосабливаться к изменениям окружающей среды, однако трансляция этих изменений в последующие поколения строго ограничена консерватизмом генетического аппарата. Старение организма определяется понижением информационной надежности генетического аппарата живых клеток в результате накопления «ошибок» при репликации ДНК и транскрипции генетической информации, что в свою очередь приводит к ошибкам при синтезе и процессинге полипептидов и белков (Бриллюэн, 1966; Сьяксте, Будылин, 1992). Стратегия биологической эволюции заключается в том, что организм, в котором накопление молекулярных дефектов генетического аппарата достигло критического уровня, изымается из популяции. Иными словами, наряду с этапами зачатия, роста и развития организма старение является эндогенно обусловленным, т. е. естественным, терминальным этапом. Оно начинается периодом стабилизации жизненных функций, угасанием репродуктивного потенциала, постепенным замедлением метаболизма и завершается периодом снижения активности и отмиранием отдельных клеточных систем и тканей. Отказ одних систем организма, как пра-

вило, приводит к увеличению нагрузок и ускоренному износу других его систем, так что «в организме может возникать каскад зависимых отказов, имитирующий картину его саморазрушения» (Гаврилов, Гаврилова, 1986. С. 83). По-видимому, аналогичный процесс накопления эндогенных дефектов ДНК в хроматине дифференцированной клетки лежит в основе апоптоза, т. е. упорядоченной клеточной смерти (Kroemer et al., 1995).

Исследования видовой продолжительности жизни организмов составляют отдельное направление в биологии, и история его развития достаточно отражена в литературе (Коли, 1979; Дильман, 1981; Анисимов, Соловьев, 1999). Результаты геронтологических исследований свидетельствуют о том, что продолжительность жизни людей зависит от многих факторов, которые с точки зрения социологии можно подразделить на индивидуальные и социальные. По оценке специалистов в этой области, продолжительность активного периода жизни пожилых людей определяется в основном условиями жизни (питание, медицинское обслуживание, условия труда, бытовые факторы). С медицинской точки зрения, факторы, определяющие активную жизнь и темпы старения человека, подразделяются на физиологические и патологические. Физиологическое (естественное) старение является условием активного долголетия и в определенной степени связано с генетическими предпосылками. Патологическое (ускоренное) старение происходит под действием внешних разрушительных факторов: инфекций, вредных условий труда, экологического неблагополучия и неблагоприятного образа жизни (Фролькис, 1990). По оценкам специалистов, старение людей в современном обществе происходит главным образом по ускоренному механизму, чем и объясняются многочисленные заболевания пожилых людей. К факторам ускоренного старения относится также отягощенная наследственность: сахарный диабет, гиперхолестеринемия, сосудистые заболевания, а также возрастное изменение конституционального иммунитета (Коркушко и др., 2002).

Все эти изменения определяются нарушениями клеточной и тканевой регуляции биосинтеза и понижают естественные барьеры сопротивляемости. Кроме того, с возрастом понижается иммунореактивность лимфоидной системы резистентности. В результате пожилые и старые люди чаще подвержены инфекционным заболеваниям и значительно тяжелее их переносят. В условиях постарения населения важнейшей задачей геронтологии и гериатрии является не

столько увеличение календарного срока жизни, сколько поддержание и увеличение продолжительности активного периода жизни людей, смещение возрастных изменений в сторону нормального процесса старения, борьба за достижение максимальных биологических пределов продолжительности жизни (Дильман, 1987).

4.1. Молекулярные механизмы старения

Несмотря на многоуровневую иерархию, все механизмы регуляции гомеостаза выполняют в принципе единую задачу, а именно координируют процессы биосинтеза в клетках организма путем воздействия на экспрессию генов. По современным представлениям, регуляция гомеостаза многоклеточных систем осуществляется с помощью нейроэндокринных и иммунологических механизмов. Наиболее изучена роль нервных и гормональных воздействий на процессы, позволяющие организму контролировать постоянство внутренней среды (Гомеостаз, 1981). Известно, что нервная и эндокринная системы модулируют функции иммунной системы с помощью нейротрансмиттеров, нейропептидов и гормонов, а иммунная система взаимодействует с нейроэндокринной системой с помощью цитокинов, иммунопептидов и иммунотрансмиттеров. Иммунная система обеспечивает сохранение генетического постоянства клеточного состава, т. е. она является одним из гомеостатических механизмов поддержания целостности организма (Иммунофизиология, 1993).

Принципиально важным при развитии возрастной патологии является факт резкого снижения синтеза многих регуляторных пептидов и чувствительности к ним клеток-мишеней (Kaskow et al., 1999; Хавинсон и др., 2001a). Учитывая широкий спектр биологического действия этих веществ (Ашмарин, Обухова, 1986), можно предположить, что такое изменение их продукции приводит к нарушению деятельности всех звеньев пептидной регуляции и к постепенному угасанию функций в стареющем организме. Пептидные гормоны принимают участие в регуляции старения через разные механизмы действия — эндокринный, нейрокринный, паракринный и аутокринный (Корнева, Штихнек, 1988). Так, например, эндокринный механизм действия характерен для рилизинг-гормонов гипоталамуса. Показано, что у пожилых мужчин гипоталамус вырабатывает меньше гонадо-

тропин-рилизинг гормона (люлиберина), а клетки Лейдига в семенниках слабее отвечают на действие гонадотропинов гипофиза. У старых крыс ослаблен ответ нейросекреторных клеток гипоталамуса, синтезирующих люлиберин, на возбуждение NMDA-рецепторов. Результатом таких нарушений пептидной регуляции является ослабление с возрастом секреции лютеинизирующего гормона клетками аденогипофиза, что приводит к серьезным расстройствам менструального цикла и климактерическому синдрому (Sahu, Kalra, 1998).

Кроме снижения уровня синтеза пептидов происходит и ослабление рецепторного их восприятия многими клетками и тканями-мишенями. Например, действие экзогенно введенной субстанции Р на нейроны ядра солитарного тракта у старых крыс значительно менее выражено, чем у молодых. По-видимому, это связано с обнаруженным уменьшением количества NK-1-рецепторов (специфических к субстанции Р) в данной области мозга. Также было показано ослабление эффективности действия субстанции Р на гладкие мышцы дыхательных путей. Немаловажное значение в описанных феноменах может иметь факт снижения по мере старения количества мРНК, необходимой для синтеза предшественника субстанции Р — препротахикинина А. В других исследованиях было показано, что у старых мышей тормозится или совсем исчезает стимулирующее действие бомбезина, гастрин-рилизинг пептида и активного фрагмента холецистокинина — октапептида ССК8 на хемотаксис лимфоцитов. Кроме того, при старении гастрин-рилизинг пептид и октапептид ССК8 слабее стимулируют цитотоксическую активность естественных киллеров. С возрастом также снижается уровень вазоактивного кишечинального пептида в ganglion stellatum и ослабевает ответ гладких мышц стенки тонкой кишки свиньи на действие VIP (Erlwanger et al., 1999; Хавинсон, 2001a).

При анализе динамики пептидных факторов роста в процессе старения обнаруживаются неоднозначные изменения. Так, синтез основного фактора роста фибробластов, необходимого для репарации нейронов и их отростков, с возрастом значительно снижается, тогда как уровень тромбоцитарного фактора роста, наоборот, возрастает. Старение сопровождается также повышением уровня фактора некроза опухолей. Такая дезорганизация выработки пептидных факторов роста может приводить ко многим негативным последствиям. В качестве одного из примеров можно привести

данные об изменении в этих условиях структурно-функциональной организации внеклеточного матрикса стенки вен с последующим развитием их варикозного расширения (Dru-baix et al., 1998).

Уникальной особенностью пептидной регуляции гомеостаза является процессинг полипептидов, который позволяет путем активизации пептидаз образовывать в нужном месте и в нужное время необходимое количество коротких пептидных фрагментов, обладающих более высокой биологической активностью, чем исходные соединения. С увеличением возраста животных установлено заметное снижение активности клеточных эндо- и эктопептидаз. При этом в клетках образуются и накапливаются значительные количества пептидов, которые устойчивы к имеющемуся набору пептидаз. Однако причины накопления пептидов в старых клетках и их биологическая роль окончательно не выяснены (Джалишвили, 1989).

Таким образом, инволютивные изменения при старении приводят к ослаблению функций органов и тканей, что на клеточном уровне прежде всего проявляется в нарушении синтеза специфических белков. Помимо этого, в стареющем организме человека в отличие от зрелого организма содержится меньше гормонов, витаминов, АТФ и холестерина. При анализе широкого спектра возрастных нарушений пептидной регуляции гомеостаза отчетливо прослеживается общая тенденция — старение сопровождается почти тотальным снижением синтеза и секреции регуляторных пептидов, а также ослаблением чувствительности к ним клеток-мишеней. Многочисленные результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что снижение синтеза и секреции пептидных биорегуляторов сопровождается именно нарушениями пара- и аутокринного механизма их действия, а это в свою очередь ускоряет процессы старения в организме.

Возрастные изменения в любом органе являются результатом внутренних процессов и взаимовлияния со стороны других органов. Тимус — центральный орган иммунной системы (Хавинсон, Жуков, 1992) и эпифиз, регулирующий нейроэндокринную систему (Хавинсон, Голубев, 2002), являются ключевыми органами, инволюция которых во многом определяет скорость развития процессов старения. Рассмотрим характерные нарушения регуляторных и функциональных процессов в этих органах и некоторых других системах организма.

Тимус (вилочковая железа)

Возрастная инволюция тимуса характеризуется наиболее выраженными (по сравнению с другими органами) изменениями. Более того, функциональная инволюция тимуса начинается гораздо раньше, чем это регистрируется морфологически. Процесс инволюции начинается в течение первого года жизни, а по некоторым данным — еще до рождения (Полякова и др., 2001). Относительная масса тимуса к моменту рождения максимальна, но впоследствии она постепенно уменьшается за счет опережающего роста массы тела. После полового созревания абсолютная масса тимуса уменьшается экспоненциально в большей степени за счет коркового слоя и в меньшей — за счет мозгового с замещением их соединительной и жировой тканью. При этом атрофируются тельца Гассала, нарушается правильное расположение эпителиальных клеток, уменьшается общее число лимфоцитов, накапливаются макрофаги, содержащие различные включения и обломки клеток, плазматические и тучные клетки. Поскольку тимическое микроокружение играет важную роль в «обучении» и функциональной активности Т-клеток, повреждение клеточных мембран, нарушение целостности клеточного микроокружения и дисфункция Т-клеток коррелируют между собой. С возрастом изменяется ультраструктура секреторных эпителиальных клеток и лимфоцитов (Bellamy, 1973). Падает уровень тимусных гормонов, циркулирующих в крови и оказывающих выраженное влияние на развитие и функционирование Т- и в некоторой степени В-лимфоцитов, а также на различные виды иммунологических реакций (Hirokawa, 1977). С 20-летнего возраста в сыворотке крови человека начинается постепенное снижение концентрации тимического сывороточного фактора, завершающееся полным его исчезновением к 50—60 годам. Однако уровень тимозина- α_1 и тимопоэтина, по-видимому, падает значительно раньше — этот процесс начинается с 10-летнего возраста (Bodey et al., 1997).

С возрастом отмечается развитие существенных изменений как в функциональном, так и в фенотипическом профилях Т-клеток. Фактически двумя наиболее характерными признаками снижения иммунитета являются изменение фенотипа и снижение ответа Т-клеток. Одним из наиболее существенных изменений, отмечаемых с возрастом для популяции Т-клеток, оказывается нарушение их соотношения: снижение доли естественных Т-клеток и увеличение доли со-

путствующих Т-клеток, обладающих «иммунной памятью». Кроме того, имеются доказательства снижения частоты ранних событий сигнальной трансдукции, подавления индуцированного активацией внутриклеточного фосфорилирования и снижения клеточного пролиферативного ответа на стимуляцию рецепторов Т-клеток (Ginaldi et al., 1999; Pawelec et al., 1999).

Изменения иммунной системы, связанные с инволюцией тимуса, оказывают влияние на общий гомеостаз организма (Петров, Хаитов, 1975). При старении снижается способность тимуса вносить вклад в окончательную дифференцировку лимфоцитов. Атрофия коры железы сопровождается снижением продукции иммунной системой множества секреторных факторов, в том числе тимопоэтина, тимозина α_1 , тимулина и тимического гуморального фактора, что приводит к подавлению иммунных реакций. Тем не менее при инволюции вилочковой железы мало изменяется число лимфоцитов, циркулирующих в крови. Возрастная инволюция тимуса, занимающего ключевую позицию в иммунной системе, способствует повышению заболеваемости злокачественными новообразованиями, снижению резистентности к инфекциям и более частому возникновению аутоиммунных нарушений (Ouyang et al., 2000).

Иногда ослабление иммунной системы наблюдается задолго до наступления старости, что предопределяется интенсивной химиотерапией, в частности антибиотиками, при лечении инфекционных заболеваний в молодом возрасте. При этом природный иммунный потенциал организма снижается или подавляется, и генетические механизмы не могут его восстановить, так как чаще всего наследуются дефектные или рецессивные признаки. В отдельных случаях третье поколение (внуки людей с ослабленным иммунитетом) наследует гомозиготы по рецессивным мутациям (Рапопорт, 1996).

Эпифиз (пинеальная железа)

Один из основных гормонов эпифиза — мелатонин (N-ацетил-5-метокси-триптамин, см. рис. 2) обладает уникальной широтой действия. Он является ключевым регулятором биологических ритмов, участвует в осуществлении зрительной функции, снижает уровень холестерина, повышает сопротивляемость организма стрессам и высоким нагрузкам, способствует нормализации кровяного давления. Мелатонин модулирует состояние внутриклеточных мессенджеров и(или) мемб-

ранных ионных каналов. Связываясь с цитоплазматическими рецепторами, мелатонин регулирует экспрессию генов. Кроме того, молекула мелатонина обладает антиоксидантными и антиканцерогенными свойствами. Особенностью продукции мелатонина эпифизом является выраженная суточная цикличность с пиками в ночное время. По мере старения организма пики секреции мелатонина снижаются, что имеет многочисленные последствия для нейроэндокринной системы главным образом в связи с репродуктивными функциями и реакциями на стресс, а также для иммунной системы, канцерогенеза и регуляции циркадных ритмов (Хавинсон, Голубев, 2002). Основными морфологическими проявлениями инволютивных изменений структуры эпифиза являются уменьшение общего числа пинеалцитов, концентрации РНК в них и усиление кистообразования в железе. Помимо этого, при старении в эпифизе происходит образование кальциевых конкреций. Предполагается, что это происходит из-за возрастного снижения активности Ca^{++} -АТФазы и ведет к смерти клеток. По мере старения в эпифизе развивается функциональная симпатическая депривация. Например, у крыс снижается концентрация β -адренергических рецепторов, теряется способность увеличивать число адренорецепторов в ответ на адренергическую депривацию; значительно снижается иммунореактивность на тирозингидроксилазу — маркерный фермент катехоламинергических аксонов. Вообще говоря, нарушения во внешних по отношению к эпифизу норадренергических системах стимуляции его секреторной активности вносят существенный вклад в возрастную гипofункцию эпифиза (Чазов, Исаченков, 1974).

Однако в возрасте, когда происходит выраженное снижение ночных пиков секреции мелатонина, в эпифизе не наблюдается выраженных в той же степени дегенеративных изменений (в отличие от тимуса, где снижение продукции его факторов прямо связано с дегенерацией самого органа). Возрастная инволюция эпифиза имеет более функциональную, чем органическую природу, что делает вероятной возможность восстановления его функций.

Половые железы

Помимо тимуса и эпифиза с возрастом непосредственно связана деятельность половой системы, а интенсивность продукции половых гормонов в значительной мере опреде-

ляет биологический возраст человека. Особенно это выражено у женщин в виде сложного симптомокомплекса — климакса, когда по мере старения параллельно увеличению в крови уровня гонадотропинов происходит усиление экскреции неклассических фенолстероидов. С биологической точки зрения, климакс является необходимым и неизбежным механизмом, позволяющим вывести стареющие особи из процесса воспроизводства, что целесообразно для сохранения вида. Клинически доказана общность проявлений климакса как у женщин, так и у мужчин. Это позволяет считать его по своей сущности физиологическим синдромом, обусловленным возрастными сдвигами в гормональном и общем обмене и прежде всего возрастным угасанием функции половых желез. У мужчин он наступает позже, чем у женщин, протекает менее заметно и сливается с признаками старости. Происходит снижение уровня тестостерона, что коррелирует с повышением концентрации в плазме крови холестерина и атерогенных липидов. Особенно отчетливо андрогенная недостаточность проявляется в изменении структуры и функции основных органов-мишеней тестостерона — предстательной железы и семенных пузырьков, находящихся в прямой зависимости от андрогенных стимулов. Нарушение метаболизма тестостерона в ткани предстательной железы способствует местному накоплению дигидротестостерона, что в конечном итоге приводит к возникновению аденомы и рака предстательной железы (Finch, Kirkwood, 2000).

Сосуды

По современным представлениям, атеросклероз является основной возрастной патологией сосудов (Чеботарев и др., 1982). Долгое время основной теорией возникновения атеросклероза считалась «липидная», но в 1980 г. было обнаружено существование эндотелиального релаксирующего фактора — оксида азота (NO), что явилось причиной пересмотра сложившихся представлений в отношении атерогенеза. В результате возникли гипотеза первичной эндотелиальной дисфункции и многофакторная теория развития и прогрессирования атеросклероза как полиорганного системного процесса (Furchgott, Zavadski, 1980). В настоящее время установлено, что в патогенезе атеросклероза не последнюю роль играют реакции, которые принято относить к воспалительным. Синтез целого ряда факторов роста, участвую-

щих в формировании атеросклеротического поражения, осуществляется в эндотелии, а увеличение их продукции происходит под действием медиаторов воспаления. Деструктивные изменения сосудистой стенки лежат в основе формирования аневризм, пристеночных и облитерирующих тромбов, интрамуральных кровоизлияний.

Возрастные изменения в тканях глаза подчиняются общим законам старения сосудистой системы организма, но вместе с тем имеют свои особенности, обусловленные структурно-функциональной спецификой зрительного анализатора и наличием механизма ауторегуляции в системе его кровоснабжения. Снижение кровообращения и транскapиллярного обмена веществ способствует возникновению дистрофических изменений в сетчатке глаза. В основе таких процессов также лежат нарушения метаболизма специфических белков в пигментном эпителии и других слоях сетчатки. При развитии возрастной патологии у старого человека мутнеет ткань хрусталика и поражается сетчатка, увеличивается масса соединительной ткани, меняется структура волокон коллагена (Румянцев, 1983; Трофимова, Хавинсон, 2002).

В главе 1 при рассмотрении тканеспецифических регуляторных пептидов было продемонстрировано, что интегрирующую и координирующую функцию пептидной саморегуляции на молекулярном уровне выполняет мозг, т. е. центральная нервная система. При исследовании нормального старения также обнаруживается ведущая роль центральной нервной системы и головного мозга в процессах саморегуляции на уровне целого организма.

Головной мозг

Старение мозга представляет собой один из самых драматических процессов онтогенеза. Сенильные изменения в центральной нервной системе начинают возникать довольно рано — первые проявления могут появиться уже после 30 лет. Их наличие характеризуется уменьшением количества нервных клеток, снижением мозгового кровотока, что сопровождается уменьшением массы мозга, нарастанием величины свободного пространства между костями черепа и тканью мозга. Однако уменьшение количества нейронов не является определяющим фактором в понижении функции нервной системы. Большее значение имеет сохранение функ-

циональных связей между нейронами, которые осуществляются благодаря нейротрансмиттерам, взаимодействующим со специфическими рецепторами. Недавно было экспериментально доказано (Рейхардт и др., 2001), что в процессе естественного старения происходит последовательное разобщение регуляторных систем нейронов мозга. При этом в первую очередь появляются изменения сигнальных каскадов на уровне клеточного ядра, позднее происходят нарушения структурно-функциональных свойств синаптических мембран и их деградация, а затем отмечаются расстройства памяти. Кроме того, в старческом возрасте в некоторых структурах мозга (*nucleus caudatus*, *putamen*) обнаружено снижение содержания серотонина, норадреналина, допамина. Эти нарушения также сочетаются со снижением памяти, замедлением скорости реакций, снижением переносимости обычных нагрузок.

При нормальном старении возрастные изменения во многом проявляются недостаточностью концентрации внимания, особенно при получении слухо-речевой информации. Другие когнитивные функции (интеллект, речь) существенно не страдают. Нарушения внимания и памяти в пожилом возрасте обычно не прогрессируют или прогрессируют крайне медленно. Быстрое прогрессирование когнитивных нарушений в пожилом возрасте — признак заболевания головного мозга. Отражением инволютивных процессов в ЦНС служат нейродегенеративные заболевания, основными среди которых являются болезни Альцгеймера (БА) и Паркинсона (БП).

Болезнь Альцгеймера характеризуется триадой морфологических признаков, в которую входят наличие β -амилоидных бляшек (сенильных бляшек), спутанность нейрофибрилл и обширная деструкция нервной ткани, особенно в гиппокампе и коре головного мозга (Dickson, 1997). Важным биохимическим механизмом БА является прогрессирующий ацетилхолинергический дефект метаболизма нейромедиаторных систем. Патологические механизмы БА включают также оксидативный стресс и накопление свободных радикалов, что в свою очередь способно привести к избыточному перекисному окислению липидов, нарушению целостности нейрональных мембран и постепенной гибели мозговых клеток. В последние годы все более доминирует концепция, согласно которой оксидативный стресс является «основным виновником» деструкции нейронов при БА.

Болезнь Паркинсона представляет собой серьезное нейродегенеративное заболевание, которое характеризуется про-

грессирующей деградацией допамин-содержащих нейронов в черной субстанции ствола головного мозга. Разрушение этих катехоламинергических нейронов сопровождается рядом сенсорных и моторных нарушений, которые приводят к тремору, ригидности и акинезии. По имеющимся оценкам, у больных с выраженными проявлениями БП популяция допаминергических нейронов оказывается истощенной по крайней мере на 80 %. В большинстве случаев первые признаки возникновения БП опережают появление явных симптомов паркинсонизма на 5—10 лет (Olanov, Tatton, 1999). В соответствии со свободнорадикальной теорией БП, допаминергические нейроны разрушаются вследствие относительно высокой частоты воздействия на них реактивных кислородных соединений, особенно H_2O_2 (перекиси водорода), которая продуцируется в процессе как ферментативной (через моноаминоксидазу) активности, так и неферментативной (обусловленной самоокислением) деструкции допamina. Оксидативный стресс не только разрушает допаминергические нейроны, но также подвергает митохондрии окислительному фосфорилированию, приводящему к уменьшению выработки энергии этими органеллами и в конечном итоге к гибели нейронов.

Выше были приведены современные представления о возрастной инволюции наиболее важных для жизнедеятельности органов и систем. Старение — процесс неизбежный, но его можно отсрочить за счет продления периода активной жизни. В этом и заключается основная задача геронтологии.

В ходе изучения процессов возрастной инволюции были получены данные, свидетельствующие о том, что решение проблемы продления здоровой трудоспособной жизни вполне реально (Фролькис, Мурадян, 1988). Так, например, ранее считалось, что тимус практически перестает функционировать уже по достижении человеком среднего подросткового возраста (14—16 лет). Однако данные исследований последних лет свидетельствуют о том, что в действительности тимус у взрослых может способствовать восстановлению Т-клеток. Кроме того, экстраполяция экспериментальных данных по возрастной динамике клеточного микроокружения позволяет сделать вывод, что полное истощение ретикулоэпителиальной ткани тимуса и его тимоцитов может наступить только к 120 годам жизни (Bodey et al., 1997). Подобные обнадеживающие результаты получены и для других

органов. Как уже было отмечено выше, пинеальная железа человека не подвергается выраженной дегенерации при возрастной инволюции. Интересные данные были получены при изучении эндотелия роговицы человека в возрастном аспекте (Robert et al., 2001). Была обнаружена способность эндотелиальных клеток роговицы человека к неполной полиплоидизации митотических клеток — варианту нормальной пролиферации клеток, что является характерным для долго живущих и слабо пролиферирующих тканей. Увеличение с возрастом числа полиплоидных клеток в эндотелии роговицы свидетельствует об активации адаптационных механизмов в ходе возрастной инволюции.

Таким образом, есть основания считать, что организм обладает потенциальными эндогенными механизмами, способными обеспечить более долгую и, главное, более здоровую жизнь (Яковлев и др., 1990). Для продления активного периода жизни важно выяснить эти механизмы и разработать способы влияния на них. В этом направлении наиболее многообещающими могут оказаться поиск и разработка путей коррекции возрастной патологии, направленной на замедление развития и исправление тех нарушений в синтезе, секреции и рецепции биологически активных молекул, которые лежат в основе механизма возрастной инволюции органов и тканей.

4.2. Теоретические и экспериментальные предпосылки коррекции возрастной патологии

Медицинские проблемы лечения старческих болезней были сформулированы в античной науке Гиппократом, разработаны Ибн Синоу в «Каноне», нашли дальнейшее развитие в средневековой медицине и детально разрабатываются в настоящее время на современном уровне развития химии, фармакологии и медицины.

Очевидно, что здоровая старость сохраняет в организме значительную сумму ресурсов для преодоления последствий болезней. Однако эти ресурсы могут быть быстро утрачены из-за психологических стрессов. В частности, нормальное физиологическое старение каждого человека проходит с определенной индивидуальной скоростью: физические и ментальные функции ослабевают постепенно в течение многих лет. Резкое извлечение человека из активной и привычной социальной деятельности (например, в результате выхода на

пенсию) не совпадает по темпу с более медленным старением его организма и приводит к значительным психологическим стрессам, которые часто провоцируют дополнительные болезни (WHO. Working group, 1982). Для нормального долголетия постепенность смены социального статуса пожилого человека должна соответствовать темпам изменения функционального статуса его организма. При этом существенное значение имеет психологическая подготовка человека к неизбежности конца. Если нам угрожает несчастье (а смерть всегда рассматривается как несчастье), то существуют два выхода из положения: можно пытаться избежать несчастья и можно его достойно встретить. Первый путь — преодоление личной смерти пока остается в неопределенной перспективе. Второй путь рано или поздно открывается перед любым человеком. Нормальное физиологическое старение помогает воспринять окончание жизни не только как необходимость, но и как личное благо.

Роль мозга и сознания была подтверждена при экспериментальном сравнении эффективности лекарственной и безлекарственной программ помощи старым людям. Безлекарственная программа предусматривала тренировку памяти и стимуляцию познавательной способности пациентов для компенсации и преодоления возрастного ослабления их памяти. Вместо активных лекарств они получали плацебо. Контрольная группа получала только активные лекарства. Эффективность этих двух методов оценивалась независимыми обследованиями пациентов и по субъективной оценке результатов самими пациентами. Объективное обследование показало сравнимость эффективности лекарственных и безлекарственных методов. На вопрос: «Считаете ли вы это лечение эффективным? Благодаря чему — таблеткам или тренировкам памяти вы чувствуете улучшение?» — большинство пациентов ответило, что благодаря тренировкам памяти (Israel et al., 1987).

По-видимому, значение интеллектуальных нагрузок в качестве укрепляющих упражнений для пожилых людей еще не нашло правильной оценки в практической геронтологии. Более того, рекомендации для улучшения самочувствия пожилых людей сводятся, как правило, к рациональному низкокалорийному питанию, понижению температуры тела и специальным физическим упражнениям (Уолфорд и др., 1980; Коркушко и др., 2002). Иначе говоря, контроль за массой тела и двигательная активность представляются достаточными средствами для профилактики старения. При этом

нормы рационального питания вычисляются по калорийности пищевых продуктов, определенной по теплоте их сгорания в калориметре в атмосфере кислорода (Скурихин, Нечаев, 1991). Очевидно, что определяемый таким образом низкокалорийный рацион не подходит для пожилых людей, у которых с возрастом складывается индивидуальный баланс пищеварительных ферментов, меняются активность гликокаликса и проницаемость эндотелия кишечника (Гальперин, Лазарев, 1986). Кроме того, современные схемы рационального питания не учитывают возрастающие с годами потребности организма в сбалансированной по аминокислотному составу белковой пище, в нативных пептидах и нуклеиновых кислотах для компенсации дефицита эндогенного биосинтеза этих компонентов.

Как уже указывалось выше, заболевания стареющего организма требуют специальной лечебной тактики, так как в пожилом возрасте всякий диагноз сопряжен с рядом нарушений всех регуляторных систем организма. По-видимому, именно системный характер процессов старения определяет в этих случаях предпочтительное использование лекарств с широким спектром биологического действия, которые являются неспецифическими стимуляторами фундаментальных процессов в организме: клеточного дыхания и пролиферации, репарации поврежденной ДНК, коррекции гемодинамики, поддержания иммунного потенциала организма, укрепления памяти и психологического статуса. Это, как правило, экстракты из растительных и животных тканей, композиции этих экстрактов и дополнения (в микродозах) минеральных компонентов (Амасиаци, 1990; McNamara, 1995).

Природные компоненты содержатся в комплексных геропротекторных препаратах, эффективность которых была доказана в клинике Института геронтологии АМН Украины, а именно в экстрактах плаценты и селезенки, в цитотоксической сыворотке, в комплексных препаратах с аминокислотами и АТФ (Коркушко и др., 2002).

В настоящее время существуют различные подходы к разработке геропротекторных препаратов. Значительную часть среди них представляют антиоксиданты, иммуномодуляторы, антидиабетические препараты. Их эффективность подтверждена экспериментальными исследованиями, которые показали, что эти препараты позволяют увеличивать не только среднюю, но и максимальную продолжительность жизни животных.

Однако современные достижения в области аналитической биохимии и пептидного синтеза, с одной стороны, и в

области генной инженерии — с другой, позволяют детально и на молекулярном уровне изучать способы коррекции возрастных изменений, как нормальных, так и патологических (Уолфорд и др., 1980). Разрабатываются способы получения комплексных лечебных препаратов с установленным компонентным составом для специфической, в частности тканеспецифической, коррекции физиологических функций (Федорова и др., 1974; Карпов и др., 1985; Ямсков, Ямскова, 1998).

Как было показано в предыдущих главах, регуляторные пептиды (РП) выделяются различными клетками и тканями как эндокринные и аутокринные носители информации о локальном гомеостазе. Кроме того, они образуются в результате ограниченного протеолиза высокомолекулярных белков, находящихся в гуморальной среде. Эти сравнительно низкомолекулярные пептиды обладают широким спектром биологического действия и координируют выполнение биологических функций различными органами и тканями. К числу РП относятся многие пептидные гормоны, однако в настоящее время в связи с открытием диффузной эндокринной системы невозможно обнаружить четкие различия между понятиями «регуляторный пептид» и «пептидный гормон».

Изучение механизмов старения организма показало, что они определенным образом связаны с пептидной регуляцией гомеостаза. Известно, что в процессе старения в тимусе и эпифизе, т. е. в центральных органах иммунной и эндокринной систем, происходит значительное снижение синтеза пептидов, что приводит к нарушению пептидной регуляции гомеостаза (Яковлев и др., 1991; Хавинсон и др., 2001a). Поэтому концепция замедления процессов старения путем восстановления пептидной саморегуляции организма с помощью РП экзогенного происхождения является в современной геронтологии логически и патогенетически обоснованной и перспективной.

Начало биорегулирующему направлению в медицине положили В. Г. Морозов и В. Х. Хавинсон (1983, 1985, 1996). Они разработали способ выделения из двух ключевых органов — тимуса и эпифиза, инволюция которых прежде всего приводит к ускорению процессов старения, комплекса полипептидов, способных при введении в организм восстанавливать функции этих органов и замедлять темп старения организма (Морозов, Хавинсон, 1973). Такие комплексы регуляторных пептидов получили позднее название цитомедины. Для них характерен высокий уровень очистки от ну-

клеиновых кислот, углеводных и липидных компонентов и практически полное отсутствие аллергических и побочных реакций при инъекционном применении (Хавинсон и др., 2001в). При экспериментальном изучении было показано нормализующее действие эпиталамина на уровень мелатонина (Анисимов и др., 1992), активность антиоксидантной системы (Анисимов и др., 1997), продолжительность жизни и частоту спонтанных опухолей у животных (Анисимов, Хавинсон, 1991). Клинические исследования показали, что препараты (цитомедины), выделенные из различных органов и тканей, тканеспецифически стимулируют регенерацию тканей, восстанавливают иммунитет, эндокринную систему и центральную нервную систему (Анисимов и др., 1993; Хавинсон, Шутак, 2000; Рыжак и др., 2001). В настоящее время накоплен значительный опыт применения эпиталамина и тималина в гериатрической практике. Было показано, что эти препараты обладают способностью препятствовать развитию наиболее важных процессов, лежащих в основе старения и связанных с ними возрастных заболеваний (Хавинсон, Морозов, 1991; Анисимов и др., 1994). В случаях возрастного ослабления иммунитета регуляторные пептиды иммунной системы и их комплексные препараты оказываются, по-видимому, единственным эффективным средством компенсации утраченной функции организма (Яковлев и др., 1990).

Принципиально важным является вопрос о заместительном или стимулирующем характере цитомединовой терапии. Сопоставление периода жизни активных пептидов, вводимых в кровь, измеряемого минутами (Ашмарин, Каменская, 1988), и продолжительности курса лечения цитомединами (как правило, 5—10 дней), с одной стороны, с длительностью лечебного эффекта (несколько месяцев или лет) — с другой, определенно указывает на стимулирующий характер данного вида терапии. Это дает основание полагать, что экзогенное введение цитомединов временно замещает поврежденное звено физиологической регуляции и позволяет организму восстановить ослабленную или утраченную функцию, а затем уже самостоятельно поддерживать ее в течение длительного времени. На такую возможность указывал К. В. Судаков. Он считал, что в старческом возрасте при естественном старении избирательно выключаются определенные функциональные системы или их отдельные компоненты. При этом еще возможно возникновение некоторых компенсаторных функциональных систем старого организма (Судаков, 1984).

Механизм такого действия, как нам представляется, основан в первую очередь на способности цитомединов восстанавливать и поддерживать синтез белка в соответствующем органе на уровне, свойственном молодому организму. При этом происходит восстановление разрушенных белковых клеточных рецепторов, что нормализует чувствительность клеток и к другим гуморальным регуляторам. Например, таким действием на рецепторы Т-лимфоцитов обладает цитомедин из ткани вилочковой железы — тималин (Напалков и др., 1998; Морозов и др., 2000). Стимулирующее влияние, которое цитомедины, полученные из тканей головного мозга животных (кортексин и эпیتالамин), оказывают на развитие коры и подкорковых образований головного мозга, позволяет рассматривать эти препараты в качестве наиболее перспективных лекарственных средств при нейродегенеративных процессах (Рыбников, Закуцкий, 2000; Рыжак и др., 2001).

В клинических условиях была подтверждена эффективность применения эпیتالамина при климактерической миокардиопатии (Комаров и др., 1995), а также сочетанного применения эпیتالамина и тималина у пожилых женщин при развитии возрастной патологии (Хавинсон, Соловьева, 1998). Следует также отметить крайне важные результаты применения цитомединов в эксперименте и клинике при ряде патологических процессов: при этом произошли не только восстановление функций органов, но и нормализация структуры ткани (Хавинсон и др., 2000а).

Для более тонкой коррекции и сохранения физиологических функций в организме используются препараты РП, полученные синтетическим путем в соответствии с аминокислотной последовательностью природных РП (Иванов, Берлин, 2000). При этом разработано несколько подходов к их синтезу (Andersson et al., 2000). В некоторых случаях с целью повышения устойчивости синтетического аналога регуляторного пептида к действию клеточных эндопептидаз в пептидную цепь добавляются гидрофобные аминокислотные остатки (Ашмарин, Каразеева, 1999).

Принципиально важным в эволюции нашей концепции о пептидной биорегуляции старения является поиск веществ с точно установленной структурой, что позволит более глубоко изучить механизм их действия и создавать на основе этих веществ лекарственные препараты.

Начало этих исследований было положено созданием нового иммуномодулирующего препарата на основе синтети-

ческого пептида — тимогена (Морозов и др., 1997). Биоактивный дипептид сначала был выделен из тималина, а затем синтезирован из глутаминовой кислоты и триптофана. Установлено, что тимоген оказывает стимулирующее действие на все этапы дифференцировки Т-лимфоцитов (от стволовой клетки до эффекторов клеточного иммунитета), индуцирует экспрессию дифференцировочных антигенов этих клеток, нормализует количество и соотношение Т- и В-лимфоцитов в крови при патологических состояниях (Морозов и др., 2000б). Необходимо отметить, что тимоген обладает аналогичной тималину биологической активностью в значительно меньших дозах.

Однако следует подчеркнуть, что выделение индивидуальных пептидов и определение их биологической активности является чрезвычайно трудоемкой задачей, которая требует длительного определения активности многих сотен пептидов, что практически трудно осуществимо. В связи с этим был разработан принципиально новый подход к поиску и синтезу физиологически активных пептидов. На основе исследования рангового порядка аминокислот в составе комплексных препаратов класса цитомединов и обнаружения повторяющихся олигопептидных блоков в составе регуляторных белков были определены аминокислотные последовательности, обладающие специфическими регуляторными свойствами (см. раздел 1.4.1). Такой подход позволил в последние годы разработать и синтезировать в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН пептидные биорегуляторы функциональной активности тимуса, коры головного мозга, эпифиза, сетчатки, сосудов, сердца, бронхов. Они получили общее название цитогены.

Сравнительное изучение биологической активности цитомединов и цитогенов показало множество сходных эффектов при их воздействии на различные органы и ткани организма в норме и патологии. Так, пептиды вилон и эпиталон, созданные на основе анализа соответственно тималина и эпиталамина, способствовали увеличению продолжительности жизни и снижению частоты возникновения спонтанных опухолей, что полностью соответствует результатам экспериментов с комплексными препаратами тимуса и эпифиза (Анисимов В. Н. и др., 2001, 2002б). Следует отметить, что использованные в указанных экспериментах дозировки цитогенов были, как правило, в 1000 раз меньше, чем при изучении цитомединов. Более того, было показано, что

цитогены *in vivo* и *in vitro* также обладают тканеспецифическим и геропротекторным действием (Хавинсон, Мыльников, 2000; Хавинсон и др., 2000б; Анисимов В. Н. и др., 2002). Исследование влияния цитогенов на морфофункциональные характеристики различных органов показало тканеспецифический протекторный эффект вилона и эпиталона по отношению к структурной сохранности сосудов и нормализации микроциркуляторных расстройств в этих органах (Хавинсон и др., 2001д). В экспериментальных исследованиях было также установлено, что эпиталон восстанавливает уровень мелатонина и кортизола и компенсирует нарушения нейроэндокринной регуляции у старых обезьян (Хавинсон и др., 2001б).

Применение пептидных биорегуляторов позволяет направленно воздействовать на пораженный орган. В связи с этим важно отметить мнение Р. В. Петрова о том, что регуляторные пептиды являются лечебными препаратами нового поколения, осуществляющими природно-направленное корректирующее действие без побочных эффектов (Петров и др., 2000).

По нашим представлениям, пептидные биорегуляторы обладают свойством контролировать экспрессию генов и процессы синтеза белка в клетках. Так, например, при изучении действия синтетического пептида печени на кинетику синтеза белка в монослойной культуре гепатоцитов крыс разного возраста установлено восстановление под влиянием пептида интенсивности и ритма белкового синтеза (Бродский и др., 2001). На основании полученных результатов следует предположить, что геропротекторное действие коротких пептидов связано с восстановлением в клетках процессов биосинтеза белков. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что пептидные биорегуляторы способны также изменять функциональную активность генома на различных стадиях клеточного цикла и воздействовать на процессы синтеза мРНК, которая обеспечивает синтез специфических клеточных белков (Морозов и др., 2000а). Это тем более важно, если учесть определяющую роль генетического аппарата в механизмах развития многих заболеваний (Бочков и др., 2002).

При осложненных психофизиологических состояниях пожилых людей с патологическим типом старения требуется оптимизация способов введения пептидных препаратов в организм. Кроме препаратов для инъекций разработаны лекарственные формы РП для трансдермального и перорального применения (Chien, 1992).

Как известно, кожа человека обладает не только развитой сенсорной системой, но и системой капиллярного транспорта биологически активных компонентов. Регуляция трансдермальных потоков извне через кожу в лимфатическую систему и в кровоток поддерживается гидрофильно-липофильным балансом между эпидермисом и стенками сосудов. Определенные сдвиги в состоянии нервной и эндокринной систем у лиц пожилого возраста приводят к изменениям физиологических функций кожи. Снижается влагосодержание кожи, замедляется отшелушивание рогового слоя клеток, в эпидермисе и дерме уменьшается содержание мукополисахаридов, холестерина и фосфолипидов. В этих условиях тканеспецифические липосомальные кремы, содержащие РП, служат не только средством целенаправленной доставки РП в организм, но и компенсируют снижение влагосодержания и фосфолипидов в составе дермы (Chien, 1992).

Разработка пероральных форм пептидных гормонов и регуляторов базируется на создании их молекулярных комплексов с полимерным носителем, который защищает пептид от воздействия кислой среды желудочного сока и от разрушительного действия гидролитических ферментов желудочно-кишечного тракта (Davis, 1990). При этом в качестве полимера-носителя могут быть использованы как синтетические гидрофильные сополимеры (Akala et al., 1998), так и биополимеры растительного и животного происхождения: эфиры целлюлозы, декстранов и других углеводов, мукополисахариды, РНК и ДНК.

На ранних этапах изучения нуклеиновых кислот в качестве лечебных средств при лучевых поражениях организма и при возрастных дисфункциях головного мозга недооценивалась роль пептидных примесей, которые были прочно связаны с нуклеиновыми кислотами и всегда присутствовали в изучаемых препаратах нуклеиновых кислот (Федорова и др., 1974). При пероральном применении препаратов дрожжевой РНК, не очищенных от пептидов, у пожилых пациентов наблюдалось улучшение мозговых процессов, в том числе восстанавливалась память (Cameron et al., 1963). Как уже указывалось в главе 3, нуклеиновые кислоты и их тканеспецифические комплексы могут поглощаться клетками по механизму эндоцитоза и проникать в клеточное ядро (Глебов, 1987). Дальнейшая судьба экзогенных нуклеиновых кислот в клетке не совсем ясна, но можно предполагать, что нуклеопротеиновые комплексы, защищенные от разрушения ферментами в лизосомах, принимают участие в процессах репарации ДНК хроматина.

Использование нуклеиновых кислот в качестве носителей регуляторных пептидов при создании пероральных лекарственных форм особенно перспективно на современном уровне представлений о роли факторов транскрипции в аутокринной саморегуляции клеточных популяций (Alberts et al., 1994)

Физико-химические свойства изученных нами модельных и природных комплексов ДНК с регуляторными пептидами и белками были детально представлены в разделе 3.3. Для практического применения необходимо было провести оценку их биологической активности и тканеспецифичности.

Клетки различных органов и тканей отличаются по набору мембранных рецепторов. Наряду с рецепторами, которые необходимы для обеспечения жизни клеток на всех этапах развития организма, дифференцированная клетка на стадии интерфазы обнаруживает тканеспецифические рецепторы, ответственные за связывание специфических лигандов (см. раздел 2.2).

Для исследования специфического связывания биологически активных макромолекул с клеточными рецепторами широко применяются методы аффинной хроматографии. Основной недостаток обычных аффинных сорбентов — низкая эффективность использования специфических рецепторов при их химической пришивке к пористому инертному носителю, а также потеря нативности и некоторых физиологических функций рецепторов из-за процедуры химической модификации. В литературе описан метод получения аффинных сорбентов на основе фрагментов клеточных мембран эритроцитов, лимфоцитов и гепатоцитов, иммобилизованных в матрицу полиакрилонитрила. Эти сорбенты проявляют высокую тканеспецифическую селективность связывания своих природных белков-лигандов (Грушка и др., 1988; Чернова, Гуревич, 1996). Аналогичные сорбенты могут быть использованы для определения селективности связывания пептидов и НПК с клеточными мембранами определенной дифференцированной ткани.

При проведении исследований тканеспецифичности природных НПК нами использован метод пространственной иммобилизации клеточных мембран мозговой ткани и предстательной железы в пористую полимерную матрицу полиакрилонитрила (Ряднова и др., 2001). В связи с тем что морфология и сорбционная емкость полученных аффинных сорбентов не были стандартизованы, аффинная хроматогра-

Таблица 11

**Взаимодействие пептидных препаратов и НПК
с аффинным сорбентом, содержащим клеточные мембраны
коры головного мозга**

Система	Концентрация компонентов, мг/см ³	Коэффициент связывания, K
Нативная ДНК	0.5	1.7
Инсулин	4.5	1.0
Кортексин	0.8	3.2
Гепалин	0.8	2.4
ДНК—инсулин	0.6—4.2	1.1
ДНК—кортексин	0.3—1.8	2.2
ДНК—гепалин	0.3—1.8	1.8
НПК мозга	5.0	4.5
НПК печени	5.0	2.9

фия явилась методом сравнительной оценки селективности связывания природных и модельных нуклеопротеиновых комплексов с рецепторами клеточных мембран мозговой ткани и предстательной железы. Селективность оценивали по величине коэффициента связывания K . При отсутствии селективного взаимодействия $K = 1$.

В табл. 11 приведены значения коэффициентов связывания с аффинным сорбентом для инсулина, цитомединов мозга и печени, их комплексов с ДНК и природных НПК мозга и печени (цитаминов).

Анализ представленных данных показывает, что нативная ДНК в некоторой степени связывается с аффинным сорбентом. Это можно объяснить не только неспецифическим связыванием ДНК с полимерной матрицей, но и возможным взаимодействием ДНК с мембранными структурами. По-видимому, подобные взаимодействия лежат в основе проникновения макромолекул ДНК через клеточные и ядерные мембраны (Кабанов, Кабанов, 1995). При включении неспецифического белка инсулина в комплекс с ДНК повышается степень его связывания с клеточными мембранами. Это является определенным аргументом в пользу возможности использования комплексообразования неядерных белков с ДНК для транспорта таких белков в клетку, а возможно и в клеточное ядро.

НПК, содержащий кортексин, связывается с аффинным сорбентом сильнее, чем свободная ДНК. Очевидно, это

происходит за счет селективных взаимодействий полипептида, входящего в комплекс, с мембранными рецепторами. Подобный эффект наблюдается для комплекса ДНК с гепалином. Природный НПК мозга (церебрамин) связывается с сорбентом сильнее, чем модельный нуклеопротеиновый комплекс ДНК—кортексин. По-видимому, природный НПК содержит не только пептиды, специфично связывающиеся с клеточными мембранами мозговой ткани и входящие в состав кортексина, но и другие регуляторные белки хроматина, которые также взаимодействуют с рецепторами. Возможно, к ним относятся кислые фосфопротеины, содержащиеся в ядре клеток и выполняющие регуляторные функции (Teng et al., 1971).

При включении кортексина и гепалина в комплекс с ДНК уменьшается коэффициент связывания этих препаратов с клеточными мембранами. Наиболее вероятным объяснением этого факта является то, что часть иммобилизованных клеточных рецепторов, расположенная во внутренних областях гранул аффинного сорбента, стерически менее доступна для высокомолекулярных НПК, чем для низкомолекулярных пептидов.

Сравнение констант связывания природных нуклеопротеиновых комплексов показывает, что НПК мозга более чем в 1.5 раза интенсивнее связывается с клеточными мембранами клеток мозга по сравнению с НПК печени (гепатамин). Наблюдаемая разница селективности связывания этих препаратов является одним из возможных механизмов реализации тканеспецифического воздействия НПК на физиологические функции. Разница коэффициентов связывания модельных НПК, включающих тканеспецифические пептиды, и природных НПК, выделенных из той же ткани, может быть связана с конформационными различиями ДНК, входящей в состав этих комплексов. Природные НПК содержат нативную ДНК, уже специфически связанную с регуляторными пептидами хроматина, а модельные НПК содержат высокоочищенные фрагменты двухцепочечной ДНК тимуса теленка, на которой не может быть сайтов для специфического связывания с регуляторными пептидами мозга. По-видимому, функция такой ДНК в модельных НПК сводится только к защите пептидных компонентов от ферментного гидролиза.

Аналогичные результаты были получены при сравнении связывания НПК, выделенных из сердца, печени, простаты, коры головного мозга и тимуса (корамин, гепатамин, про-

сталамин, церебрамин и тимусамин соответственно) с аффинным сорбентом, содержащим иммобилизованные фрагменты клеточных мембран ткани простаты. Максимальной селективностью связывания с этим сорбентом обладает препарат НПК, выделенный из простаты ($K = 3.4$). Очевидно, что он содержит аутокринные регуляторные пептиды, которые характерны для простаты и обладают повышенным сродством к клеткам этой ткани. Поэтому природный НПК простаты может более прочно связываться с мембранами этой ткани. Коэффициенты связывания остальных исследованных НПК, выделенных из других тканей, ниже на 30—40 %.

Тканеспецифическая биологическая активность НПК печени и мозга была исследована в органотипической культуре спинномозговых ганглиев и фрагментов коры головного мозга цыплят (Хавинсон и др., 1997). Чувствительные нейроны эксплантатов этих тканей отвечают усилением роста нейритов на введение в культуру ультрамалых концентраций нейротрофических факторов (Levi-Montalcini, 1982). Результаты биотестирования природных НПК, выделенных из мозга и печени, свидетельствуют о стимулирующем эффекте НПК мозга: рост нейритов увеличивается на 40 % по сравнению с контролем. Стимулирующего эффекта НПК, выделенного из печени, на рост нейритов зарегистрировано не было. Полученный результат свидетельствует не только о биологической активности НПК, выделенного из мозга по отношению к нейронам, но и об определенной тканеспецифичности природных нуклеопротеиновых комплексов.

Такая особенность природных НПК оказывается большим преимуществом при разработке пероральных форм этих препаратов для коррекции и стимуляции функций определенных органов гериатрических пациентов. Механизм доставки тканеспецифических нуклеопротеиновых комплексов к целевым органам может быть представлен следующим образом.

Усвоение нуклеопротеиновых комплексов во всем диапазоне их молекулярных масс и тканевой принадлежности происходит в тонком кишечнике на реснитчатой поверхности путем эндоцитоза. Эндоцитоз — процесс, характерный для большинства клеток, уже рассматривался в разделе 2.2. Он представляет собой адсорбцию лиганда на внешней поверхности клеточной мембраны, после чего происходит прогибание этого участка мембраны внутрь клетки вместе со связанным веществом, замыкание мембраны с образова-

ем везикулы и отрыв этой везикулы во внутреннее пространство клетки (Глебов, 1987), последний этап называют интернализацией лиганда (Willeman et al., 1985). Дальнейший путь интернализированного НПК зависит от его специфичности. Некоторые клетки (например, эндотелий капилляров, кишечный эпителий), захватывая вещества путем эндоцитоза, экскретируют их путем экзоцитоза в сторону соседних клеток, в том числе клеток-мишеней. Такой феномен получил название «транскитоз». Благодаря этому механизму, комплексы могут транспортироваться к целевым органам, для которых они специфичны, преодолевая тканевые барьеры.

Нуклеопротеиновый комплекс, достигший целевой ткани, может быть включен в митохондриальные структуры или в клеточное ядро в зависимости от селективности связывания с мембранами этих органелл. Было продемонстрировано *in vitro* проникновение белков, ответственных за контроль клеточного цикла, через ядерную оболочку внутрь ядра (Protein targeting, 1993). Аналогичный механизм возможен для межтканевого и внутриклеточного транспорта НПК.

По-видимому, существует глубокая аналогия репаративных механизмов клетки при эндоцитозе тканеспецифических НПК и апоптотических тел. Как уже упоминалось, в процессе старения и естественной деградации клетки (апоптоза) происходит ограниченное и организованное саморазрушение клеточных структур (в отличие от некроза): хроматин и цитоплазматический материал разделяются на компактные фрагменты, эти фрагменты обволакиваются прилежащим участком мембраны, при этом клетка распадается на так называемые апоптотические тела, которые поглощаются соседними клетками дифференцированной ткани по механизму эндоцитоза и частично используются для репарации этих клеток, в том числе для репарации хроматина. Встраивание экзогенных ДНК в хроматин клеток может происходить лишь при наличии разрывов полинуклеотидной цепи ДНК клетки-хозяина, которые обычно наблюдаются в поврежденных и стареющих клетках (Сьяксте, Будылин, 1992). В этом случае еще одним преимуществом применения природных тканеспецифических нуклеопротеиновых комплексов является то, что ДНК-компоненты этих комплексов содержат участки, гомологичные поврежденным участкам ДНК определенной дифференцированной ткани человеческого организма, так как они выделены из такой же, но молодой и здоровой ткани млекопитающих.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами рассмотрен экспериментальный и теоретический материал, касающийся особенностей структуры и свойств пептидов, которые селективно взаимодействуют с фосфолипидными клеточными мембранами и с хроматином клеточного ядра. Мы преследовали цель выделить те формы межмолекулярных взаимодействий, которые определяют жизненно важные и прежде всего регуляторные биологические функции пептидов. В работе не представлены особенности взаимодействия пептидов с другими биологически важными компонентами живых клеток: с углеводами, триглицеридами, стероидами, простагландинами и неорганическими ионами. Перечисленные взаимодействия также важны для саморегуляции живой системы и ее адаптации к окружающей среде. Наше упущение объясняется не столько меньшим вниманием современных исследователей к этим взаимодействиям, сколько достаточно скромными авторскими претензиями «объять необъятное». Мы стремились понять и оценить вклад регуляторных пептидов в изменение жизненно важных биологических структур (бислойных фосфолипидных мембран, двойных спиралей ДНК). По-видимому, мы преуспели только в постановке задачи и пришли к определенным концептуальным выводам.

Во-первых, взаимодействия регуляторных пептидов (РП) с рецепторными структурами клеточных мембран, с поверхностью фосфолипидного слоя и с двойной спиралью ДНК происходят по кооперативному механизму при точном пространственном соответствии позиций функциональных групп обоих участников.

Во-вторых, хотя эти взаимодействия полифункциональны и термодинамически обратимы, как показывают расчеты констант связывания в этих системах, абсолютные значения свободной энергии связывания достаточно велики и опре-

деляются энтропийными (информационными) изменениями в системе.

В-третьих, тканеспецифические межмолекулярные взаимодействия РП находят отражение в активности нейронов мозга и влияют на выделение нейротрансмиттеров. Мозг (центральная нервная система) контролирует и координирует пептидную саморегуляцию на уровне целого организма. По-видимому, не случайно локальное нарушение или общее понижение пептидной саморегуляции сопровождается симптомами психической депрессии, особенно характерной для пожилых и старых людей.

В-четвертых, общеизвестные методы расчета оптимальных молекулярных конформаций для взаимодействующих пептидов, фосфолипидов и ДНК предусматривают только однородное окружение участников, т. е. не учитывают локального изменения ионизации функциональных групп, гидратации и молекулярных конформаций участников при минимизации свободной энергии системы. Решение этой задачи требует не только разработки более точных молекулярных моделей, но и проведения комплекса экспериментальных исследований.

Тем не менее имеющиеся к настоящему времени теоретические концепции и экспериментальные наблюдения позволили отыскать и обосновать методы получения и использования регуляторных олигопептидов, компенсирующих дефицит потенциала саморегуляции пораженных и стареющих организмов. В настоящее время это направление развития гериатрической практики представляется наиболее перспективным.

В заключение авторы выражают благодарность за критические замечания и ценные советы при подготовке рукописи акад. РАМН И. П. Ашмарину, проф. д-ру мед. наук В. Г. Морозову и д-ру мед. наук В. В. Малинину.

ЛИТЕРАТУРА

Адамсон А. Поверхность раздела вода—полимер // Вода в полимерах. М.: Мир, 1984. С. 91—114.

Алексеев Л. П., Орехович В. Н. Новое в проблеме сердечно-сосудистой регуляции: эндокринная функция сердца // Вопр. мед. химии. 1987. Т. 33, № 3. С. 1—15.

Амасиаци Д. Ненужное для неучей. М.: Наука. 1990. 880 с. (Сер. Науч. наследство; Т. 13).

Анисимов В. Н., Арутюнян А. В., Хавинсон В. Х. Влияние мелатонина и эпителина на активность системы антиоксидантной защиты у крыс // Докл. РАН. 1997. Т. 352, № 6. С. 831—833.

(Анисимов В. Н., Бондаренко Л. А., Хавинсон В. Х.) Anisimov V. N., Bondarenko L. A., Khavinson V. Kh. Effect of pineal peptide preparation (epithalamin) on life span and pineal and serum melatonin level in old rats // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1992. Vol. 673. P. 53—57.

Анисимов В. Н., Соловьев М. В. Эволюция концепций в геронтологии. СПб.: Эскулап, 1999. 130 с.

Анисимов В. Н., Хавинсон В. Х. Влияние полипептидного препарата эпифиза на продолжительность жизни и частоту спонтанных опухолей у старых самок крыс // Докл. АН СССР. 1991. Т. 319, № 1. С. 250—253.

Анисимов В. Н., Хавинсон В. Х., Алимова И. Н. и др. Эпиталон угнетает развитие опухолей и экспрессию онкогена HER—2/NEU в опухолях молочной железы у трансгенных мышей с ускоренным старением // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2002а. Т. 133, № 2, С. 199—202.

(Анисимов В. Н., Хавинсон В. Х., Михальский А. И., Яшин А. И.) Anisimov V. N., Khavinson V. Kh., Mikhalski A. I., Yashin A. I. Effect of synthetic thymic and pineal peptides on biomarkers of ageing, survival and spontaneous tumor incidence in female CBA mice // Mech. Ageing Develop. 2001. Vol. 122, N 1. P. 41—68.

Анисимов В. Н., Хавинсон В. Х., Морозов В. Г. Роль пептидов эпифиза в регуляции гомеостаза: двадцатилетний опыт иссле-

дования // Успехи соврем. биологии. **1993**. Т. 113, № 6. С. 752—762.

(Анисимов В. Н., Хавинсон В. Х., Морозов В. Г.) Anisimov V. N., Khavinson V. Kh., Morozov V. G. Twenty years of study on effect of pineal peptide preparation: epithalamin in experimental gerontology and oncology // Ann. N.Y. Acad. Sci. **1994**. Vol. 719. P. 483—493.

(Анисимов В. Н., Хавинсон В. Х., Попович И. Г., Забежинский М. А.) Anisimov V. N., Khavinson V. Kh., Popovich I. G., Zabezhinski M. A. Inhibitory effect of peptide Epitalon in colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats // Cancer Lett. **20026**. Vol. 183. P. 1—8.

Анисимов С. В., Бохелер К. Р., Хавинсон В. Х., Анисимов В. Н. Изучение действия пептидов вилона и эпیتالона на экспрессию генов в сердце мыши с помощью технологии на основе микрочипов // Бюл. эксперим. биологии и медицины. **2002**. Т. 133, № 3. С. 340—347.

Ашмарин И. П., Каменская М. А. Нейропептиды в синаптической передаче. М.: ВИНТИ, **1988**. 184 с. (Итоги науки и техники. Сер. Физиология человека и животных; Т. 34).

Ашмарин И. П., Каразеева Е. П. Нейропептиды // Биохимия мозга. СПб.: Изд-во СПбГУ, **1999**. С. 232—266.

Ашмарин И. П., Лелекова Т. В., Санжиева Л. Ц. Об эффективности ультрамалых доз и концентраций биологически активных соединений // Изв. РАН. Сер. биол. **1992**. № 4. С. 531—536.

Ашмарин И. П., Обухова М. Ф. Регуляторные пептиды, функционально-непрерывная совокупность // Биохимия. **1986**. Т. 51, № 4. С. 531—544.

Балаж А., Блажек И. Эндогенные ингибиторы клеточной пролиферации. М.: Мир, **1982**. 302 с.

Белл Р. Протон в химии. М.: Мир, **1977**. 382 с.

(Белокрылов Г. А., Попова О. Я., Деревнина О. Н. и др.) Belokrylov G. A., Popova O. Ya., Derevnina O. N. et al. Immuno-, phagocytosis modulating and antitoxic properties of amino acids and peptide preparations // Drug Develop. Ind. Pharm. **1998**. Vol. 24, N 2. P. 115—127.

Бериал Дж. Возникновение жизни. М.: Мир, **1969**. 357 с.

Биологические мембраны: Методы / Под ред. Дж. Финдлея и У. Эванза. М.: Мир, **1990**. 424 с.

Бирштейн Т. М. Дипольный момент клубкообразной полипептидной цепи // Высокомолекуляр. соединения. **1975**. Сер. А. Т. 17, № 1. С. 58—61.

Бирюзова В. И. Ультраструктурная организация дрожжевой клетки: Атлас. М.: Наука, **1993**. Т. 3. 224 с.

Богуславский Л. И. Биоэлектрохимические явления и граница раздела фаз. М.: Наука, **1978**. 360 с.

Бочков Н. П., Соловьева Д. В., Стрекалов Д. Л., Хавинсон В. Х. Роль молекулярно-генетической диагностики в прогнозировании и профилактике возрастной патологии // *Клин. медицина*. **2002**. № 2. С. 4—8.

Браун Г., Уолкен Дж. Жидкие кристаллы и биологические структуры. М.: Мир, **1982**. 198 с.

Бриллюэн Л. Научная неопределенность и информация. М.: Мир, **1966**. 272 с.

Бродский В. Я., Хавинсон В. Х., Золотарев Ю. А. и др. Ритм синтеза белка в культурах гепатоцитов крыс разного возраста. Норма и действие пептида ливагена // *Изв. РАН. Сер. биол.* **2001**. № 5. С. 517—521.

Бульенков Н. Ф. Самоорганизующиеся триплетные структуры идеальных фракталов «связанной» воды с симметрией D_3 и T // *Кристаллография*. **1990**. Т. 35, № 1. С. 147—149.

Валуев И. Л., Валуев Л. И., Платэ Н. А. О механизме действия препаратов иммобилизованного инсулина для перорального применения // *Докл. РАН*. **1998**. Т. 360, № 1. С. 57—60.

Вегнер Р. Э., Ритума И. Р., Чипенс Г. И. Структура и биологические свойства тимопоетина II, тимозина α_1 , их фрагментов и аналогов // *Изв. АН ЛатвССР*. **1984**. № 12. С. 63—76.

Вернадский В. И. Философские мысли натуралиста. М.: Наука, **1988**. 520 с.

Винер Н. Кибернетика или управление и связь в животном и машине. М.: Наука, **1983**. 344 с.

Витвицкий В. Н., Соболева Л. С., Шевченко В. А. Изменение цитотоксического и цитогенетического эффектов радиации при введении в организм препаратов РНК, выделенных из различных тканей // *Изв. РАН. Сер. биол.* **2000**. № 3. С. 290—293.

Власов Г. П., Изварина Н. Я., Илларионова Н. Г. и др. Влияние полимерной модификации инсулина на его ферментативный гидролиз и конформационные свойства // *Прикл. биохимия и микробиология*. **1988**. Т. 24, № 1. С. 56—61.

Волькенштейн М. В. Биофизика. М.: Наука, **1981**. 576 с.

Волькенштейн М. В., Фишман С. И. Теория влияния ионизации на степень α -спиральности полипептида // *Биофизика*. **1967**. Т. 12, № 1. С. 14—17.

Габуда С. П. Связанная вода. Факты и гипотезы. Новосибирск: Наука, **1982**. 160 с.

Габуда С. П., Ржавин А. Ф. Обнаружение возрастных изменений в молекулярной структуре коллагена // *Молекуляр. биология*. **1976**. Т. 10, вып. 5. С. 998—1001.

Габуда С. П., Ржавин А. Ф. Ядерный магнитный резонанс в кристаллогидратах и гидратированных белках. Новосибирск: Наука, **1978**. 160 с.

Гаврилов Л. А., Гаврилова Н. С. Биология продолжительности жизни. М.: Наука, 1986. 168 с.

Гальперин Ю. М., Лазарев П. И. Пищеварение и гомеостаз. М.: Наука, 1986. 304 с.

Глебов Р. Н. Эндоцитоз и экзоцитоз. М.: Высш. шк., 1987. 96 с.

Говырин В. А., Жоров Б. С. Лиганд-рецепторные взаимодействия в молекулярной физиологии. СПб.: Наука, 1994. 240 с.

Гольдманский В. И. Молекулярное химическое туннелирование — факты и гипотезы. Черногоровка: Ин-т хим. физики АН СССР, 1979. 45 с.

Гомазков О. А. Физиологически активные пептиды: Справочное руководство. М.: ИПГМ, 1995. 144 с.

Гомазков О. А. Мозг и нейропептиды: Справочно-информационное издание. М.: Ин-т биомед. химии РАМН, 1997. 170 с.

Гомеостаз / Ред. П. Д. Горизонтов. М.: Медицина, 1981. 576 с.

Грушка З., Тырачкова В., Тищенко Г. А., Шатаева Л. К. Структура и проницаемость композиционных карбоксильных мембран на основе полиакрилонитрила // Collection Czechoslovak Chem. Commun. 1988. Vol. 53. P. 3089—3095.

Давыдов А. С. Солитоны в молекулярных системах. Киев: Наук. думка, 1984. 288 с.

Дебатов В. Г. ДНК-вакцинация и генотерапия на основе транзитной экспрессии нуклеиновых кислот в соматических клетках человека и животных // Молекуляр. биология. 1997. Т. 31, № 2. С. 209—215.

Де Дюв К. Путешествие в мир живой клетки. М.: Мир, 1987. 256 с.

Джалишвили Т. А. Механизм модулирующего действия пептидов. Тбилиси: Мецниереба, 1989. 224 с.

Дильман В. М. Большие биологические часы: Введение в интегральную медицину. М.: Знание, 1981. 207 с.

Дильман В. М. Четыре модели медицины. М.: Медицина, 1987. 288 с.

Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. М.: Наука, 1989. 276 с.

Егоров Е. Е. Вокруг теломеразы // Молекуляр. биология. 1999. Т. 33, №3. С. 385—392.

Замятин А. А. Дилатометрия растворов белков. М.: Наука, 1973. 104 с.

Замятин А. А. Физико-химические особенности эндогенных регуляторных олигопептидов // Биофизика. 1990. Т. 35, № 4. С. 555—559.

Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. М.: Мир, 1987. 584 с.

Зубова С. Г., Окулов В. Б. Роль молекул адгезии в процессе распознавания чужеродных и трансформированных клеток макрофагами млекопитающих // Успехи соврем. биологии. 2001. Т. 121, №1. С. 59—66.

Иваницкий Г. Р., Деев А. А. Механизм волнового взаимодействия как модель дозированной секреции веществ // Докл. РАН. 2001. Т. 381, № 3. С. 412—416.

Иванов В. Т., Берлин Ю. А. Молекулярная биология в 2000 году: прогнозы, реальность и снова прогнозы // Биоорган. химия. 2000. Т. 26, № 10. С. 752—755.

(Иванов В. Т., Карелин А. А., Филиппова М. М. и др.) **Ivanov V. T., Karelin A. A., Philippova M. M. et al.** Hemoglobin as a source of endogenous bioactive peptides: the concept of tissue-specific peptide pool // Biopolymers (Peptide Sci). 1997. Vol. 43, N 2. P. 171—188.

Иванова М. А., Смолин А. В., Щербакова О. Г., Филатов М. В. Влияние полиэлектролитных свойств ДНК на протонирование цитозина // Молекуляр. биология. 1998. Т. 32, № 4. С. 635—638.

Ивенси И., Скейлак Р. Механика и термодинамика биологических мембран. М.: Мир, 1982. 304 с.

Ильичева И. А., Флорентьев В. Л. Четырехцепочечные комплексы олигонуклеотидов — квадруплексы // Молекуляр. биология. 1992. Т. 26, № 3. С. 512—531.

Иммунофизиология / Ред. Е. А. Корнева. СПб.: Наука, 1993. 684 с.

Иогансен А. В. Инфракрасная спектроскопия и спектральное определение энергии водородной связи // Водородная связь / Ред. Н. Д. Соколова. М.: Наука, 1981. 286 с.

Кабанов А. В., Кabanov В. А. Интерполиэлектролитные комплексы нуклеиновых кислот как средство доставки генетического материала в клетку // Высокомолекуляр. соединения. 1994. Т. 36, № 2. С. 198—211.

(Кабанов А. В., Кabanov В. А.) **Kabanov A. V., Kabanov V. A.** DNA complexes with polycations for the delivery of genetic material into cells // Bioconjugate Chem. 1995. Vol. 6. P. 7—20.

Кабанов А. В., Киселев В. И., Чикиндас М. Я. и др. Повышение трансформирующей активности плазмидной ДНК путем ее включения в интерполиэлектролитный комплекс с карбоцепным поликатионом // Докл. АН СССР. 1989. Т. 306, № 1. С. 226—229.

Кагава Я. Биомембраны. М.: Высш. шк., 1985. 303 с.

Карпов Р. С., Слепушкин В. Д., Мордовин В. Ф. и др. Использование препаратов эпифиза в клинической практике. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1985. 152 с.

Кеплен С. Р., Эссиг Э. Биоэнергетика и линейная термодинамика необратимых процессов. М.: Мир, 1986. 382 с.

Киселева Е. П., Огурцов Р. П., Попова О. Я. и др. Сравнительная характеристика двух пептидных иммуномодуляторов // Иммунология. 1999. № 2. С. 23—26.

Киселева О. И., Пышкина О. А., Кумазава Н. и др. Исследование специфических взаимодействий в системе ДНК-гистон на модельных

объектах // II Междунар. конф. «Химия высокоорганизованных веществ и научные основы нанотехнологии»: Тез. докл. СПб.: УНЦ химии СПбГУ, 1998. С. 104.

Климов П. К. Пептиды и пищеварительная система. Л.: Наука, 1983. 272 с.

Климов П. К., Барашкова Г. М. Эндогенные пептиды как единая система регуляторных веществ // Физиол. журн. СССР им. И. М. Сеченова. 1993. Т. 79, № 3. С. 80—87.

Климонтович Ю. Л. Энтропия и информация открытых систем // Успехи физ. наук. 1999. Т. 169, № 4. С. 443—452.

Князькин И. В., Полякова В. О. Действие вилона на тимус и селезенку в радиационной модели преждевременного старения // Успехи геронтологии. 2002. Вып. 9. С. 105—109.

Князькин И. В., Южаков В. В., Чалисова Н. И., Григорьев Е. И. Функциональная морфология органотипической культуры селезенки крыс различного возраста при действии вилона // Успехи геронтологии. 2002. Вып. 9. С. 110—115.

Кокряков В. Н. Биология антибиотиков животного происхождения. СПб.: Наука, 1999. 164 с.

Коли Г. Анализ популяций позвоночных. М.: Мир, 1979. 364 с.

Комаров Ф. И., Хавинсон В. Х., Симоненкова В. А., Меркурьева Г. А. Применение эпиталамина при климактерической миокардиопатии // Клин. медицина. 1995. Т. 73, № 4. С. 40—42.

Конышев В. А. Питание и регулирующие системы организма. М.: Медицина, 1985. 222 с.

Коркушко О. В., Хавинсон В. Х., Бутенко Г. М., Шатило В. Б. Пептидные препараты тимуса и эпифиза в профилактике ускоренного старения. СПб.: Наука, 2002. 204 с.

Корнева Е. А., Головкин О. И., Казакова Т. В. Молекулярно-биологические аспекты взаимодействия нервной и иммунной систем // Вопр. мед. химии. 1999. Т. 43, № 5. С. 321—329.

Корнева Е. А., Шхинец Э. К. Гормоны и иммунная система. Л.: Наука, 1988. 248 с.

Кравцов А. В., Алексеенко И. Р. Поверхностно-активные вещества как инструменты исследования биомембран. Киев: Наук. думка, 1993. 262 с.

Кричевская А. А., Лукаш А. И., Шугалей В. С., Бондаренко Т. И. Аминокислоты, их производные и регуляция метаболизма. Ростов н/Д: Изд-во Рост. ун-та, 1983. 112 с.

Кувичкин В. В. ДНК-липидные взаимодействия in vitro и in vivo // Успехи соврем. биологии. 2000. Т. 120, № 5. С. 466—476.

Кузник Б. И., Морозов В. Г., Хавинсон В. Х. Цитомедины и их роль в регуляции физиологических функций // Успехи соврем. биологии. 1995. Т. 115, № 3. С. 353—367.

Кузник Б. И., Морозов В. Г., Хавинсон В. Х. Цитомедины: 25-летний опыт экспериментальных и клинических исследований. СПб.: Наука, 1998. 310 с.

Кузник Б. И., Пинелис И. С., Хавинсон В. Х. Применение пептидных биорегуляторов в стоматологии. СПб.: Эскулап, 1999. 142 с.

Кульберг А. Я. Рецепторы клеточных мембран. М.: Высш. шк., 1987. 104 с.

Куций М. П., Кузнецова Е. А., Газлев А. И. Участие протеиназ в апоптозе // Биохимия. 1999. Т. 64, № 2. С. 149—163.

Левицкий Д. О. Кальций и биологические мембраны. М.: Высш. шк., 1990. 124 с.

Ленинджер А. Биохимия. М.: Мир, 1974. 958 с.

Лишко В. К., Шевченко М. И. Мембраны и жизнь клетки. Киев: Наук. думка, 1987. 104 с.

Ляшенко А. А., Уваров В. Ю. К вопросу о систематизации цитокинов // Успехи соврем. биологии. 2001. Т. 121, № 6. С. 589—603.

Марголис Г. С., Бьюсе Д. В. Система калликреин—кинин в почках // Гормоны и почки / Ред. Б. М. Бреннер и Д. Г. Стейн. М.: Мир, 1983. С. 139—173.

Мартынкина Л. П., Колесников А. А., Стрельцов С. А. и др. Электронно-микроскопические исследования компактизации кольцевых ДНК в модельных системах. 2. Комплексы синтетического пептида тривалина с кольцевыми ДНК большого молекулярного веса // Молекуляр. биология. 1998. Т. 32, № 4. С. 614—620.

Мартынкина Л. П., Семенов Т. Е., Венгеров Ю. Ю. Электронно-микроскопическое изучение компактизации индивидуальных молекул ДНК в пленках при взаимодействии с гистоном H1 // Молекуляр. биология. 1991. Т. 25, № 5. С. 1338—1344.

Мартынов В. Ф., Леонтьева Л. И., Сорочинская Е. И. и др. Индукция дифференцировки Т-клеток-предшественников крови и костного мозга человека синтетическими фрагментами тимических факторов // Иммунология. 1986. № 4. С. 24—26.

Марьянович А. Т., Поляков Е. Л. Нейропептиды и гематоэнцефалический барьер // Успехи физиологии. 1991. Т. 22, № 2. С. 33—51.

Мецлер Д. Биохимия. Химические реакции в живой клетке: В 3-х т. М.: Мир, 1980. Т. 3. 378 с.

Морозов В. Г., Рыжак Г. А., Малинин В. В. Цитамин (биорегуляторы клеточного метаболизма). 2-е изд., доп. СПб.: Фолиант, 2000а. 119 с.

Морозов В. Г., Хавинсон В. Х. Влияние веществ, выделенных из гипоталамуса, на иммуногенез и морфологический состав крови // Эксперим. хирургия и анестезиология. 1973. № 1. С. 19—22.

Морозов В. Г., Хавинсон В. Х. Новый класс биологических регуляторов многоклеточных систем — цитомедины // Успехи соврем. биологии. 1983. Т. 96, № 3(6). С. 339—352.

Морозов В. Г., Хавинсон В. Х. Роль клеточных медиаторов (цитомединов) в регуляции генетической активности // Изв. АН СССР. Сер. биол. **1985.** № 4. С. 581—587.

Морозов В. Г., Хавинсон В. Х. Пептидные биорегуляторы (25-летний опыт экспериментального и клинического изучения). СПб.: Наука, **1996.** 74 с.

(Морозов В. Г., Хавинсон В. Х.) **Morozov V. G., Khavinson V. Kh.** Natural and synthetic thymic peptides as therapeutics for immune dysfunction // Intern. J. Immunopharm. **1997.** Vol. 19, N 9/10. P 501—505.

Морозов В. Г., Хавинсон В. Х., Малинин В. В. Пептидные тимомиметики. СПб.: Наука, **2000б.** 158 с.

Морозов В. Г., Хавинсон В. Х., Писарев О. А. Выделение из тимуса и изучение природы фактора, стимулирующего иммуногенез // Докл. АН СССР. **1977.** Т. 233, № 3. С. 491—494.

Напалков Н. П., Яковлев Г. М., Анисимов В. Н. и др. Перспективы применения препаратов тимуса для профилактики рака // Вопр. онкологии. **1998.** Т. 30, № 5. С. 515—521.

Начала физиологии / Ред. акад. А. Д. Ноздрачев. СПб.: Лань, **2001.** 1088 с.

Никифорова А. А. Лецитин: холестерин — ацетилтрансфераза плазмы крови // Биохимия липидов и их роль в обмене веществ. М.: Наука, **1981.** С. 85—105.

Пальцев М. А., Иванов А. А. Межклеточные взаимодействия. М.: Медицина, **1995.** 224 с.

Панарин Е. Ф. Основные типы и принципы синтеза биологически активных полимеров // Синтез, структура и свойства полимеров / Ин-т высокомолекуляр. соединений АН СССР). Л.: Наука, **1989.** С. 187—198.

Панин Л. Е., Кузьменко А. П., Потеряева О. Н., Скрыль Г. Ш. Обнаружение апопротеин А-1 иммунореактивности в хроматине ядер гепатоцитов крыс // Биохимия. **1992.** Т. 57, № 6. С. 826—831.

Панков Ю. А. Все органы и ткани животных и человека являются эндокринными и секретируют в кровь гормоны пептидной природы // Вопр. мед. химии. **1996.** Т. 42, № 3. С. 179—184.

Панков Ю. А., Поздняков В. И., Туманян В. Г. Анализ локального сходства первичных структур белковых гормонов // Молекуляр. биология. **1976.** Т. 10, № 2. С. 423—436.

Пансевич Л. И., Барковский Е. В. Особенности распределения сочетаний аминокислотных остатков в первичной структуре кальмодулина // Биофизика. **1990.** Т. 35, № 4. С. 581—584.

Петров Р. В., Михайлова А. А., Фомина Л. А., Степаненко Р. Н. Миелопептиды. М.: Наука, **2000.** 181 с.

Петров Р. В., Хайтов Р. М. Иммунный ответ и старение // Успехи соврем. биологии. **1975.** Т. 79, № 1. С. 111—127.

Полинг Л. Общая химия. М.: Мир, 1964. 584 с.

Поляков Л. М., Панин Л. Е. Липопротеиновая регуляция метаболических процессов // Успехи соврем. биологии. 2000. Т. 120, № 3. С. 265—273.

Полякова В. О., Кветной И. М., Хавинсон В. Х. и др. Тимус и старение // Успехи геронтологии. 2001. Вып. 8. С. 50—57.

Пономарева-Степная М. А., Незавибатько В. Н., Антонова Л. В. и др. Аналог АКТГ (4—10) — стимулятор обучения пролонгированного действия // Хим.-фармацевт. журн. 1984. Т. 18, № 7. С. 790—795.

Попов М. Е. Структурная организация белка. М.: Наука, 1997. 604 с. (Сер. Проблема белка; Т. 3).

Потаман В. И., Арефеева И. А., Алфеева Л. Ю. и др. Аналог тафцина с пролонгированным действием на центральную нервную систему млекопитающих // Биол. мембраны. 1992. Т. 9, № 10—11. С. 1082—1084.

Препаративная биохимия липидов / Ред. Л. Д. Бергельсон и Э. В. Дятловицкая. М.: Наука, 1981. 256 с.

Пушкина Н. В. Амидированность белков при старении организма // Укр. биохим. журн. 1977. Т. 51, № 6. С. 680—683.

Рабинович М. И., Трубецков Д. И. Введение в теорию колебаний и волн. М.: Наука. 1984. 432 с.

Райхлин Н. Т., Кветной И. М., Осадчук М. А. APUD-система (общепатологические и онкологические аспекты). Обнинск: Мед. радиол. науч. центр РАМН. 1993. Ч. 1. 127 с.

Рапопорт И. А. Индукция иммунитета как очередная задача химического мутагенеза // Гены, эволюция, селекция: Избр. тр. М.: Наука, 1996. С. 196—202.

Рейхардт Б. А., Куликова О. Г., Сапронов Н. С. Динамика нарушений регуляторных систем нейронов мозга при возрастной амнезии у крыс // Психофармакология и биол. наркология. 2001. Т. 1, №1. С. 38—42.

Розенкранц А. А., Ячменев С. В., Соболев А. С. Использование искусственных конструкций для селективного переноса генетического материала в клетки человека путем рецептор-опосредованного эндоцитоза // Докл. АН СССР. 1990. Т. 312, № 2. С. 493—494.

Романов Ю. А., Кетлинский С. А., Антохин А. И., Окулов В. Б. Кейлоны и регуляция деления клеток. М.: Медицина, 1984. 208 с.

Рудзит В. К. Диабетогенные метаболиты триптофана как причина сахарного диабета. Рига: Зинатне, 1981. 83 с.

Румянцев С. Н. Конституциональный иммунитет и его молекулярно-экологические основы. Л.: Наука, 1983. 212 с.

Русанов А. И. К термодинамике нуклеации на заряженных центрах // Докл. АН СССР. 1978. Т. 238, № 4. С. 831—834.

Рыбников В. Ю., Закуцкий Н. Г. Пептидная регуляция функций мозга / Под ред. В. Х. Хавинсона. СПб.: Фолиант, 2000. 40 с.

Рыжак Г. А., Малинин В. В., Платонова Т. Н. Кортиксин и регуляция функций головного мозга / Ред. А. А. Скоромец и В. Х. Хавинсон. СПб.: Фолиант, 2001. 160 с.

Ряднова И. Ю., Чернова И. А., Шатаева Л. К., Хавинсон В. Х. Аффинная хроматография нуклеопротеиновых комплексов // Вопр. мед. химии. 2001. Т. 47, № 2. С. 209—216.

Ряднова И. Ю., Шатаева Л. К., Хавинсон В. Х. Взаимодействие ДНК с белками в модельных системах // Высокомолекуляр. соединения. 2000а. Т. 42, № 5. С. 1—7.

Ряднова И. Ю., Шатаева Л. К., Хавинсон В. Х. Тканеспецифические нуклеопротеиновые комплексы // Вопр. мед. химии. 2000б. Т. 46, № 1. С. 62—71.

Сазанов Л. А., Зайцев С. В. Действие сверхмалых доз (10^{-18} — 10^{-14} М) биологически активных веществ: общие закономерности, особенности и возможные механизмы // Биохимия. 1992. Т. 57, № 10. С. 1443—1460.

Скурихин И. М., Нечаев А. П. Все о пище с точки зрения химика. М.: Высш. шк., 1991. 288 с.

Судаков К. В. Общая теория функциональных систем. М.: Медицина, 1984. 224 с.

Сьяксте Н. И., Будылин А. В. Структурные изменения хроматина на различных уровнях его организации при старении // Онтогенез. 1992. Т. 23, № 3. С. 242—253.

Трофимова С. В., Хавинсон В. Х. Сетчатка и старение // Успехи геронтологии. 2002. Вып. 9. С. 79—82.

Уолфорд Р., Мередит П., Чини К. Иммуноинженерия: перспективы коррекции возрастных иммунодефицитных состояний // Иммунология и старение / Ред. Т. Макинодан и Э. Юнис. М.: Мир, 1980. С. 242—267.

Урсова Н. И. Современное лечение ассоциированной с *Helicobacter pylori* язвенной болезни у детей // Рос. мед. журн. 2000. Т. 8, № 17. С. 707—710.

Федорова Т. А., Терещенко О. Я., Мазурик В. К. Нуклеиновые кислоты и белки в организме при лучевом поражении. М.: Медицина, 1974. 408 с.

Филиппов А. Т. Многоликий солитон. М.: Наука, 1990. 286 с. (Библиотечка «Квант»; Вып. 48).

Фокс С., Дозе К. Молекулярная эволюция и возникновение жизни. М.: Мир, 1975. 375 с.

Франклин Т., Сноу Дж. Биохимия антимикробного действия. М.: Мир, 1984. 240 с.

Фролькис В. В. Синдромы старения // Вестн. АМН СССР. 1990. № 1. С. 8—12.

Фролькис В. В., Мурадян Х. К. Экспериментальные пути prolongation жизни. Л.: Наука, 1988. 245 с.

Хавинсон В. Х. Пептидная регуляция старения // Вестн. РАМН. 2001а. № 12. С. 16—20.

Хавинсон В. Х. Тканеспецифическое действие пептидов // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2001б. Т. 132, № 8. С. 228—229.

Хавинсон В. Х., Анисимов В. Н. Синтетический дипептид вилон (L-Lys—L-Glu) увеличивает продолжительность жизни и угнетает развитие спонтанных опухолей у мышей // Докл. РАН. 2000. Т. 372, № 3. С. 421—423.

Хавинсон В. Х., Ашмарин И. П., Малинин В. В. Возрастная динамика регуляторных пептидов // Наука долголетия. 2001а. № 1. С. 18—22.

Хавинсон В. Х., Голубев А. Г. Старение эпифиза // Успехи геронтологии. 2002. Вып. 9. С. 67—72.

(Хавинсон В. Х., Гончарова Н., Лапин Б.) Khavinson V. Kh., Goncharova N., Lapin B. Synthetic tetrapeptide epitalon restores distributed neuroendocrine regulation in senescent monkeys // Neuroendocrinology Lett. 2001б. Vol. 22. P. 251—254.

Хавинсон В. Х., Горбунов А. А., Рыжак Г. А. Влияние пептидных биорегуляторов на морфологию паренхиматозных органов. СПб.: Фолиант, 2000а. 79 с.

Хавинсон В. Х., Егорова В. В., Тимофеева Н. М. и др. Влияние пептидов вилонина и эпиталона на всасывание глюкозы и глицина в различных отделах тонкой кишки у крыс // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2002а. Т. 133, № 5. С. 570—573.

Хавинсон В. Х., Жуков В. В. Пептиды тимуса и механизмы иммуномодуляции // Успехи соврем. биологии и медицины. 1992. Т. 112, № 4. С. 554—570.

(Хавинсон В. Х., Измайлов Д. М., Обухова Л. К., Малинин В. В.) Khavinson V. Kh., Izmailov D. M., Obukhova L. K., Malinin V. V. Effect of epitalon on the lifespan increase in Drosophila melanogaster // Mech. Ageing Develop. 2000б. Vol. 120. P. 141—149.

Хавинсон В. Х., Кветной И. М. Пептидные биорегуляторы ингибируют апоптоз // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2000. Т. 130, № 12. С. 657—659.

Хавинсон В. Х., Малинин В. В. Механизмы геропротекторного действия пептидов // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2002. Т. 133, № 1. С. 4—10.

Хавинсон В. Х., Морозов В. Г. Применение пептидов тимуса в качестве геропротекторных средств // Пробл. старения и долголетия. 1991. Т. 1, № 2. С. 123—128.

Хавинсон В. Х., Морозов В. Г. Пептиды эпифиза и тимуса в регуляции старения. СПб.: Фолиант, 2001. 160 с.

(Хавинсон В. Х., Морозов В. Г., Анисимов В. Н.) Khavinson V. Kh., Morozov V. G., Anisimov V. N. Experimental studies of the pineal gland preparation Epithalamin // The pineal gland and cancer / Eds C. Bartsch et al. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2001в. Р. 294—306.

Хавинсон В. Х., Морозов В. Г., Малинин В. В. и др. Влияние пептида Lys—Glu на экспрессию гена интерлейкина-2 в лимфоцитах // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2000в. Т. 130, № 9. С. 330—332.

Хавинсон В. Х., Морозов В. Г., Чалисова Н. И., Окулов В. Б. Влияние пептидов головного мозга на клетки нервной ткани in vitro // Цитология. 1997. Т. 39, № 7. С. 571—575.

Хавинсон В. Х., Мыльников С. В. Влияние тетрапептида эпифиза на состояние антиоксидантной защиты у *Drosophila melanogaster* // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2000. Т. 129, № 4. С. 420—422.

Хавинсон В. Х., Рыбакина Е. Г., Малинин В. В. и др. Влияние коротких пептидов на реакцию бласттрансформации тимоцитов и процесс сигнальной трансдукции по сфингомиелиновому пути // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2002б. Т. 133, № 5. С. 574—577.

(Хавинсон В. Х., Соловьева Д. В.) Khavinson V. Kh., Solovieva D. V. New approach to the prophylaxis and treatment of age-related pathology // Rom. J. Geront. and Geriat. 1998. Vol. 20, N 1. P. 28—34.

Хавинсон В. Х., Чалисова Н. И., Морозов В. Г., Малинин В. В. Роль пептидов тимуса в регуляции роста лимфоидной ткани у крыс разного возраста // Докл. РАН. 1999. Т. 369, № 5. С. 701—703.

Хавинсон В. Х., Черняк С. И., Дьяконов М. М. Цитамины — средство сохранения высокой профпригодности и долголетия военнослужащих // Воен.-мед. журн. 2001г. Т. 322, № 2. С. 26—28.

Хавинсон В. Х., Шутак Т. С. Применение эпителина при инсулиннезависимом сахарном диабете. СПб.: Фолиант, 2000. 61 с.

Хавинсон В. Х., Южаков В. В., Кветной И. М. и др. Иммуногистохимический и морфометрический анализ действия вилона и эпителина на функциональную морфологию радиочувствительных органов // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2001д. Т. 131, № 3. С. 338—346.

Хусаинова Р. С., Хусаинов А. А., Попов В. И. и др. ДНК- Ca^{2+} -фосфатидилхолин // Докл. РАН. 1999. Т. 367, № 3. С. 416—419.

Чазов Е. И., Исаченков В. А. Эпифиз: место и роль в системе нейроэндокринной регуляции. М.: Наука, 1974. 238 с.

Чалисова Н. И., Хавинсон В. Х., Пеннийянен В. А., Григорьев Е. И. Влияние пептидных фракций тимуса на развитие органотипической культуры вилочковой железы и селезенки крысы // Цитология. 1999. Т. 41, № 10. С. 889—894.

Чанг Р. Физическая химия с приложениями к биологическим системам. М.: Мир, 1980. 462 с.

Чеботарев Д. Ф., Коркушко О. В., Маньковский Н. Б., Минц А. Я. Атеросклероз и возраст. Л.: Медицина, 1982. 295 с.

(Чернова И. А., Гуревич К. Я.) Chernova I. A., Gurevich K. Ya. Structure and sorption characteristics of bioaffinity membranes // J. Membrane Sci. 1996. Vol. 113. P. 161—167.

Шатаева Л. К., Ряднова И. Ю., Хавинсон В. Х. Интерполимерные комплексы дезоксирибонуклеиновой кислоты с белками // Журн. прикл. химии. 1999. Т. 72, № 6. С. 982—985.

Шатаева Л. К., Ряднова И. Ю., Хавинсон В. Х. Исследование информационно-ценности олигопептидных блоков в регуляторных пептидах и белках // Успехи соврем. биологии. 2002. Т. 122, № 3. С. 282—289.

Шатаева Л. К., Чернова И. А., Самсонов Г. В. и др. Выделение и свойства нейраминидазы холерных вибрионов // Вопр. мед. химии. 1978. Т. 24, № 4. С. 569—572.

Шеннон К. Э. Предсказание и энтропия печатного английского текста // Работы по теории информации и кибернетике. М.: Иностран. лит., 1963. С. 669—686.

Шмальгаузен И. И. Интеграция биологических систем и их саморегуляция // Бюл. МОИП. Отд. биол. 1961. Т. 66, вып. 2. С. 104—134.

Шмальгаузен И. И. Кибернетические вопросы биологии. Новосибирск: Наука, 1968. 224 с.

Эйген М., Винклер Р. Игра жизни. М.: Наука, 1979. 94 с.

Эйген М., Шустер П. Гиперцикл. Принципы самоорганизации макромолекул. М.: Мир, 1982. 270 с.

Яковлев Г. М., Новиков В. С., Хавинсон В. Х. Резистентность, стресс, регуляция. Л.: Наука, 1990. 238 с.

Яковлев Г. М., Хавинсон В. Х., Морозов В. Г., Новиков В. С. Перспективы биорегулирующей терапии // Клиническая медицина. 1991. Т. 69, № 5. С. 19—23.

Ямсков И. А., Ямскова В. П. Фармакологические препараты нового поколения на основе гликопротеинов клеточного микроокружения // Рос. хим. журн. (Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева). 1998. Т. 62, № 3. С. 85—90.

Янковский О. Ю., Довнар Т. Е. К проблеме специфичности выщепления пептидов-регуляторов из неспециализированных белков-предшественников // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 1986. Т. 22, № 1. С. 11—16.

Ярилин А. А. Основы иммунологии. М.: Медицина, 1999. 608 с.

Ярилин А. А., Никонова М. Ф., Ярилина А. А. и др. Апоптоз, роль в патологии и значимость его оценки при клинико-иммунологическом обследовании больных // Мед. иммунология. 2000. Т. 2, № 1. С. 7—16.

Adinolfi S., Bagni C., Morelli M. A. C. et al. Novel RNA-binding motif: the KH module // *Biopolymers (Peptide Sci.)*. **1999**. Vol. 51, N 2. P. 153—164.

Akala E. A., Kopeckova P., Kopecek J. Novel pH sensitive hydrogels with adjustable swelling kinetics // *Biomaterials*. **1998**. Vol. 19. P. 1037—1047

Alberts B., Bray D., Lewis J. et al. Molecular biology of the cell. 3rd ed. New York: Garland Publish., **1994**. 1294 p.

Andersson L., Blomberg L., Flegel M. et al. Large-scale synthesis of peptides // *Biopolymers (Peptide Sci.)*. **2000**. Vol. 55. P. 227—250.

Antequera F., Bird A. CpG islands // *Exs-Basel*. **1993**. Vol. 64. P. 169—185.

Arnott S., Chondraserakan R., Hall L. H. et al. DNA secondary structures: helices, wrinkles and junctions // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **1983**. Vol. 47. P. 53—67.

Atchley W. R., Wollenberg K. R., Fitch W. M. et al. Correlation among amino acid sites in bHLH protein domains: an information theoretic analysis // *Mol. Biol. and Evol.* **2000**. Vol. 17. P. 164—178.

Audhya T., Scheid M. P., Goldstein G. Contrasting biological activities of thymopoietin and splenin, two closely related polypeptide products of thymus and spleen // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **1984**. Vol. 81, N 9. P. 2847—2849.

Bairoch A., Bucher P., Hofman K. The PROSITE database, its status in 1995 // *Nucl. Acids Res.* **1996**. Vol. 24. P. 189—196.

Baumann G. Growth-hormone binding proteins // *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* **1993**. Vol. 202. P. 392—400.

Bell A., Kittler L., Lober G., Zimmer C. DNA binding properties of minor groove binders and their influence on the topoisomerase II cleavage reaction // *J. Mol. Recognit.* **1997**. Vol. 10, N 6. P. 245—255.

Bellamy D. The thymus in relation to problems of cellular growth and aging // *Gerontologia*. **1973**. Vol. 19. P. 162—184.

Belli S. L., Rechnitz G. A. Biosensors based on native chemoreceptors // *Frezenius Ztschr. Anal. Chem.* **1989**. Bd 331. S. 439—447.

Biochemical microcalorimetry / Ed. H. D. Brown. New York: Acad. Press, **1969**. 338 p.

Biotechnology of antibiotics / Ed. R. William. New York etc.: Strohl. Marcel Dekker, **1997**. 842 p. (Drugs and the pharmaceutical sciences; Vol. 82).

Bird A. The essential of DNA methylation // *Cell*. **1992**. Vol. 70. P. 5—8.

Bloomfield V. A. DNA-condensation by multivalent cations // *Biopolymers. Nucl. Acids Sci.* **1997**. Vol. 44, N 3. P. 269—282.

Boarends W. M. Histone ubiquitination and chromatin remodeling in mouse spermatogenesis // *Develop. Biol.* **1999**. Vol. 207, N 2. P. 322—333.

Bodey B., Bodey B. J., Siegel S. E., Kaiser H. E. Involution of the mammalian thymus, one of the leading regulators of aging // *In Vivo*. **1997**. Vol. 11, N 5. P. 421—440.

Bornstein M. V., Miller A., Slagle S. A pilot trial of COP-1 in exacerbating-relapsing multiple sclerosis // *N. Engl. J. Med.* **1987**. Vol. 317, N 7. P. 408—414.

Burgess R. R. Use of polyethyleneimine in purification of DNA binding protein // *Meth. Enzymol.* «Protein—DNA interactions» / Ed. R. T. Sauer. **1991**. Vol. 208. P. 3—9.

Cameron D. E., Sved S., Solyom L. et al. Effect of ribonucleic acid on memory defect in the aged // *Amer. J. Psychiat.* **1963**. Vol. 120. P. 320—325.

Cattau D., Bourgoin D., Joly M. Change of conformation of DNA by association with proteins // *Europ. J. Biochem.* **1969**. Vol. 8, N 4. P. 541—546.

Chien Y. W. Systemic delivery of pharmacologically active molecules across the skin // *Targeted Drug Delivery*. Berlin etc.: Springer-Verlag, **1992**. P. 181—230. (Handbook Exp. Pharmacol. and Ther.; Vol. 100).

Ching-Fa Wu, Wen-Yih Chen, Hwai-Shen Liu. Determination of the binding constant of imidazole and histidine with immobilized Cu(II) by differential UV spectroscopy // *J. Chem. Eng. Jap.* **1995**. Vol. 28, N 4. P. 419—423.

Choh Hao Li. Biologically active peptides // *Biochemical and biophysical studies of proteins and nucleic acids*. Berlin etc.: Elsevier, **1984**. P. 1—10.

Claud H. Role of aromatic amino acid residues in the binding of enzymes and proteins to nucleic acids // *Nature. New Biol.* **1971**. Vol. 234, N 47. P. 120—121.

Coleman J. E. Zinc proteins: enzymes, storage proteins transcription factors and replication proteins // *Annu. Rev. Biochem.* **1992**. Vol. 61. P. 897—946.

Conjugated oligomers, polymers, and dendrimers: from polyacetylene to DNA: *Proc. of the 4th Francqui colloquium, Bruxelles*, 21—23 Oct. 1998 / Ed. J.-L. Bredas. Paris: De Berg Univ., **1998**. 622 p.

Connor J., Schroit A. J. Transbilayer movement of phosphatidylserine in erythrocytes // *Biochemistry*. **1988**. Vol. 27, N 3. P. 848—851.

Cooper A. A., Stevens T. H. Protein splicing: self-splicing of genetically mobile elements at the protein level // *TIBS*. **1995**. 20 Sept. P. 351—356.

Davis S. S. Overcoming barriers to the oral administration of peptide drugs // *Trends Pharm. Sci.* **1990**. Vol. 11, N 9. P. 353—355.

Dawson P. E., Muir T. W., Clark-Lewis I., Kent S. B. H. Synthesis of proteins by native chemical ligation // *Science*. **1994**. Vol. 266, N 5186. P. 276—279.

- De Bold A. J., Borrenstein H. B., Veress A. T., Sonnenberg H.** A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats // *Life Sci.* **1981**. Vol. 28, N 1. P. 89—94.
- Deenen L. L. M.** Topology and dynamics of phospholipids in membranes // *FEBS Lett.* **1981**. Vol. 123, N 1. P. 3—15.
- Deinum G., van Langen H., van Ginkel G., Levine Y. K.** Molecular order and dynamics in planar lipid bilayers: effects of unsaturation and sterols // *Biochemistry.* **1988**. Vol. 27, N 3. P. 852—860.
- Denisov G., Wanaski S., Luan P. et al.** Binding of basic peptides to membranes produces lateral domains enriched in the acidic lipids phosphatidylserine and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: an electrostatic model and experimental results // *Biophys. J.* **1998**. Vol. 74, N 2. P. 731—744.
- Dickson D. W.** The pathogenesis of senile plaques // *J. Neuropathol. and Exp. Neurol.* **1997**. Vol. 56. P. 321—339.
- Drubaix I., Giakoumakis A., Robert L., Robert A. M.** Preliminary data on the age-dependent decrease in basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor in the human vein wall and in their influence on cell proliferation // *Gerontology.* **1998**. Vol. 44, N 1. P. 9—14.
- Dumas F., Lebrun M. C., Tocanne J.-F.** Is the protein/lipid hydrophobic matching principle relevant to membrane organisation and functions? // *FEBS Lett.* **1999**. Vol. 458. P. 271—277.
- Dynlacht B. D.** Regulation of transcription by protein, that control the cell cycle // *Nature.* **1997**. Vol. 389. P. 149—152.
- Erlwanger R. H., Unmack M. A., Grondahl M. L.** Effect of age on vasoactive intestinal polypeptide-induced short-circuit current in porcine jejunum // *Comp. Biochem. Physiol. and Mol. Integrat. Physiol.* **1999**. Vol. 124, N 1. P. 29—33.
- Erhan S., Mazzolf T., Cohen L.** Amino acid neighborhood relationships in proteins // *Intern. J. Bio-Med. Comput.* **1980**. Vol. 11, N 1. P. 67—75.
- Etemadi A.-H.** Membrane asymmetry — a survey and critical appraisal of the methodology // *Biochim. et biophys. acta.* **1980**. Vol. 604, N 3—4. P. 423—475.
- Finch C. E., Kirkwood T.** Chance, development, and aging. Oxford: Oxford Univ. Press, **2000**. 256 p.
- Fox S. V.** A theory of macromolecular and cellular origins // *Nature.* **1965**. Vol. 205. P. 238.
- Furchgott R. F., Zavadski J. V.** The obligatory role of the endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine // *Nature.* **1980**. Vol. 288. P. 373—376.
- Ginaldi L., De Martinis M., D'Ostilio A. et al.** The immune system in the elderly. 2. Specific cellular immunity // *Immunol. Res.* **1999**. Vol. 20, N 2. P. 109—115.

- Goldknopt I. L., Wilson G., Rosenbaum F. et al.** Dissappearance of protein A24 and ubiquitin during shutdown of transcription in avian erythroid cells // *Fed. Proc.* **1980**. Vol. 39, N 6. P. 255.
- Goldstein G., Scheid M., Hammerling U. et al.** Isolation of a polypeptide that has Lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **1975**. Vol. 72, N 1. P. 11—15.
- Graf J., Ogle R. C., Robey F. A. et al.** Pentapeptide from the laminin B1 chain mediates cell adhesion and binds the 67 000 Laminin receptor // *Biochemistry.* **1987**. Vol. 26, N 22. P. 6896—6900.
- Gunning M. E., Brenner B. M.** Natriuretic peptides and the kidney: current concepts // *Kidney Intern.* **1992**. Vol. 42, suppl. 38. P. 127—133.
- Halaas J. L., Gajiwala K. S., Maffei M. et al.** Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene // *Science.* **1995**. Vol. 269, N 7. P. 543—546.
- Hannappel E., Davoust S., Horecker B. L.** Isolation of peptides from calf thymus // *Biochem. and Biophys. Res. Commns.* **1982a**. Vol. 104, N 1. P. 266—271.
- Hannappel E., Davoust S., Horecker B. L.** Thymosin β_8 and β_9 : two new peptides isolated from calf thymus homologous to thymosin β_4 // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **1982b**. Vol. 82. P. 1708—1711.
- Harrison S. C.** A structural taxonomy of DNA-binding domains // *Nature.* **1991**. Vol. 353. P. 715—719.
- Hartley R. V. L.** Transmission of information // *Bell System Techn. J.* **1928**. Vol. 7, N 3. P. 535—563.
- Heijne G. von.** A sequence correlation between oppositely charged residues in secreted proteins // *Biochem. and Biophys. Res. Commns.* **1980**. Vol. 93, N 1. P. 82—86.
- Heldin C. N., Hellman U., Ishikawa F., Miyazono K.** Purification, cloning and expression of platelet—derived endothelial cell growth factor // *Meth. Enzymol.* **1991**. Vol. 198. P. 383—391.
- Herzel H., Ebeling W., Schnutt A. O.** Entropies of biosequences: the role of repeats // *Phys. Rev. E.* **1994**. Vol. 50, N 6. P. 5061—5071.
- Herzel H., Grosse I.** Measuring correlations in symbol sequences // *Physica A.* **1995**. Vol. 216, N 6. P. 518—542.
- Heymann J. B., Engel A.** Structural clues in the sequence of the Aquaporins // *J. Mol. Biol.* **2000**. Vol. 295, N 4. P. 1039—1053.
- Hinkel L., McCaig C. D., Robinson K. R.** The direction of growth of differentiating neurones and myoblasts from frog embryos in applied electric field // *J. Physiol.* **1981**. Vol. 314. P. 121—135.
- Hipkiss A. R., Worthington V. C., Himswoth D. T. M., Herwig W.** Protective effect of carnosine against protein modification mediated by malondialdehyde and hypochlorite // *Biochim. et biophys. acta.* **1998**. Vol. 1380. P. 46—54.

Hippel P. H. von, McGhee J. D. DNA-protein interactions // *Annu. Rev. Biochem.* **1972**. Vol. 41, N 1. P. 231—300.

Hirokawa K. The thymus and aging // *Immunology and aging*. New York; London: Acad. Press, **1977**. P. 51—72.

Hopp T. P., Woods K. R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **1981**. Vol. 78, N 6. P. 3824—3828.

Horlein A. J., Naar A. M., Heinzel T. et al. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor // *Nature*. **1995**. Vol. 377. P. 397—404.

Immunostimulants / Eds I. Azuma and G. Jolles. Berlin; Paris; Tokyo: Jap. Sci. Soc. Press; Springer-Verlag, **1987**. 258 p.

Israel L., Kozarevic Dj., Orgogozo J. M. Subjective and objective health in aging: problems of assessment // *Modification of cell to cell signals during normal and pathological aging* / Ed. S. Govoni and F. Battaini. Berlin etc.: Springer-Verlag, **1987**. P. 261—285.

Iverson B. L. Betas are brought into the fold // *Nature*. **1997**. Vol. 385, N 6612. P. 113—115.

Jacob F., Monod J. Genetic regulation mechanisms in the synthesis of proteins // *J. Mol. Biol.* **1961**. Vol. 3. P. 318—356.

Jaffe L. F. The role of ionic currents in establishing developmental pattern // *Phil. Trans. Roy. Soc. London B*. **1981**. Vol. 295. P. 553—556.

Jasani B., Kreil G., Mackler B. F., Stanworth D. R. Further studies on the structural requirements for polypeptide-mediated histamine release from rat mast cells // *Biochem. J.* **1979**. Vol. 181, N 3. P. 623—632.

Kaiser E. T., Kézdy F. J. Amphiphilic secondary structure: design of peptide hormones // *Science*. **1984**. Vol. 223, N 4633. P. 249—255.

Kamo N. Characteristics of biomembranes and membrane transport // *Liquid membranes. Chemical applications* / Eds T. Araki and H. Tsukube. Florida, Boca Raton: C. R. C. Press Inc., **1990**. 726 p.

Karlin S., Zuker M., Brocchieri L. Measuring residue associations in protein structures. Possible implication for protein folding // *J. Mol. Biol.* **1994**. Vol. 239, N 2. P. 227—248.

Kaskow J. W., Regmi A., Mulchahey J. J. Changes in brain corticotropin-releasing factor messenger RNA expression in aged Fisher 344 rats // *Brain Res.* **1999**. Vol. 822, N 1—2. P. 228—230.

Katan-Khaykovich Y., Shaul Y. RFX1, a single DNA-binding protein with a split dimerization domain, generates alternative complexes // *J. Biol. Chem.* **1998**. Vol. 273, N 38. P. 24504—24512.

Kohl A., Volk H.-D., Diezel W. The dipeptide Lys—Pro restores the diminished wound healing following treatment with anti-T-helper cell monoclonal antibody // *Intern. J. Immunopharmacol.* **1989**. Vol. 11, N 3. P. 237—240.

- Kolusheva S., Shahal T., Jelinek R.** Peptide-membrane interactions studied by a new phospholipid/polydiacetylene colorimetric vesicle assay // *Biochemistry*. **2000**. Vol. 39. P. 15851—15859.
- Knox D. G., Rosenberg A.** Fluctuations of protein structure as expressed in distribution of hydrogen exchange rate constants // *Biopolymers (Peptide Sci.)*. **1980**. Vol. 19, N 5. P. 1049—1069.
- Kopelman R.** Diffusion-controlled reaction kinetics // *The fractal approach to heterogeneous chemistry* / Ed. D. Avnir. New York etc.: John Wiley and Sons, **1992**. P. 295—308.
- Krauss E. M., Cowburn D.** Anomalous exchange kinetics of peptide amide protons in aqueous solutions // *Intern. J. Peptide and Protein Res.* **1981**, Vol. 17, N 1. P. 42—47.
- Kreil G.** D-aminoacids in animal peptides // *Annu. Rev. Biochem.* **1997**. Vol. 66. P. 337—345.
- Kroemer G., Petit P., Zamzami N. et al.** The biochemistry of programmed cell death // *FASEB J.* **1995**. Vol. 9, N 13. P. 1277—1287.
- Lear J. D., Schneider J. P., Kenker P. K.** Electrostatic effects on ion selectivity and rectification in designed ion channel peptides // *J. Amer. Chem. Soc.* **1997**. Vol. 119, N 14. P. 3212—3217.
- Lee D. H., Granja J. R., Martinez J. A. et al.** A self replicating peptide // *Nature*. **1996**. Vol. 382, N 6591. P. 525—528.
- Leo A., Hansch C., Elkins D.** Partition coefficients and their uses // *Chem. Revs.* **1971**. N 6. P. 525—616.
- Leonard D. A., Rajaram N., Kerppola T. K.** Structural basis of DNA bending and oriented heterodimer binding by the basic leucine zipper domains of Fos and Jun // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **1997**. Vol. 94, N 10. P. 4913—4918.
- Leszyk J., Dumasvala R., Potter J. D. et al.** Bovine cardiac Troponin-T: aminoacid sequences of the two isoforms // *Biochemistry*. **1987**. Vol. 26, N 22. P. 7035—7042.
- Levi-Montalchini R.** Developmental neurobiology and the natural history of NGF // *Annu. Rev. Neurosci.* **1982**. Vol. 5. P. 341—356.
- Levitt M.** A simplified representation of protein conformations for rapid simulation of protein folding // *J. Mol. Biol.* **1976**. Vol. 104, N 1. P. 59—107.
- Lieburg A. F. van, Knoers N. V., Deen P. M.** Discovery of aquaporins: a breakthrough in research on renal water transport // *Pediatr. Nephrol.* **1995**. N 9(2). P. 228—234.
- Lin L.-F., Doherty D. H., Lile J. D. et al.** GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons // *Science*. **1993**. Vol. 260. P. 1130—1132.
- Louis J. M., Dyda F., Nashed N. T. et al.** Hydrophilic peptides derived from the transframe region of Gag—Pol inhibit the HIV-protease // *Biochemistry*. **1998**. Vol. 37, N 8. P. 2105—2110.

Luisi B., Orozco M., Sponer J., Luque F. On the potential role of the amino nitrogen atom as a hydrogen bond acceptor in macromolecules // *J. Mol. Biol.* **1998**. Vol. 279, N 5. P. 1123—1136.

Lumry R., Rajender S. Enthalpy — entropy compensation phenomena in water solution of proteins and small molecules // *Biopolymers (Reptide Sci.)*. **1970**. Vol. 9, N 10. P. 1125—1227.

Mao Y., Sun M., Desai S. D., Leroy F. L. SUMO-1 conjugation to topoisomerase 1, a possible repair response to topoisomerase-mediated DNA damage // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **2000**. Vol. 97, N 8. P. 4046—4051.

Marks M. S., Ohne H., Kirchhausen T., Bonifacino S. J. Protein sorting by tyrosine-based signals: adapting to the Ys and wherefores // *Trends Cell Biol.* **1997**. Vol. 7. P. 124—128.

Marlow B. J., Fairhurst D., Pendse H. P. Colloid vibration potential and the electrokinetic characterisation of concentrated colloids // *Langmuir*. **1988**. Vol. 4, N 3. P. 611—626.

McGhee J. D., Felsenfeld G. Nucleosome structure // *Annu. Rev. Biochem.* **1980**. Vol. 49. P. 1115—1156.

McMurray W. C. Form and function of phospholipids / Ed. G. B. Ansell. Amsterdam: Elsevier Sci. Publ. Co, **1973**. 255 p..

McNamara S. H. Dietary supplements of botanicals and other substances: a new era regulation // *Food and Drug Law J.* **1995**. Vol. 50, N 3. P. 341—348.

Meites J. Neuroendocrine aspects of aging // *Modification of cell to cell signals during normal and pathological aging* / Eds S. Govoni and F. Battaini. Berlin etc.: Springer-Verlag, **1987**. P. 83—89.

Mitchell P. Vectorial chemistry and the molecular mechanics of chemiosmotic coupling: power transmission by proticity // *Biochem. Soc. Transactions*. **1976**. Vol. 4, N 1. P. 399—430.

Mitchell P. J., Tjian R. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA-binding proteins // *Science*. **1989**. Vol. 245. P. 371—378.

Morris A. J. Lysophospholipid signaling // *Trends Pharm. Sci.* **1999**. Vol. 20, N 3. P. 393—395.

Mosevitsky M. I., Novitskaya V. A., Plekhanov A. Yu, Skladchikova G. Yu. Neuronal protein GAP-43 is a member of novel group of brain acid-soluble proteins (BASPs) // *Neurosci. Res.* **1994**. Vol. 19, N 2. P. 223—228.

Mousli M., Bueb J.-L., Bronner C., Rouot B., Landry Y. G-protein activation: a receptor-independent mode of action for cationic amphiphilic neuropeptides and venom peptides // *Trends Pharm. Sci.* **1990**. Vol. 11, N 9. P. 358—362.

Nemeth-Cahalan K. L., Hall J. E. pH and calcium regulate the water permeability of aquaporin 0 // *J. Biol. Chem.* **2000**. Vol. 275, N 10. P. 6777—6782.

Neuman J. B., Engel A. Structural clues in the sequences of the aquaporins // *J. Mol. Biol.* **2000.** Vol. 295, N 4. P. 1039—1053.

Nucleic acid-protein recognition / Ed. H. J. Vogel. New-York: Acad. Press, **1977.** 587 p.

Okouchi S., Ashida T., Sakaguchi S. et al. Dynamics of the hydration of halogenoalcohols in aqueous solutions // *Bull. Chem. Soc. Jap.* **2002.** Vol. 75, N 1. P. 59—63.

Olanow C. W., Tatton W. G. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease // *Annu. Rev. Neurosci.* **1999.** Vol. 22. P. 123—144.

Ouyang Q., Cicek G., Westendorp R. G. J., Remarque E. J. Reduced IFN- γ production in elderly people following in vitro stimulation with influenza vaccine and endotoxin // *Mech. Ageing Develop.* **2000.** Vol. 121. P. 131—137.

Owen D., Evans P. R. A structural explanation for the recognition of tyrosine based endocytotic signals // *Science.* **1998.** Vol. 282. P. 1327—1332.

Oxford Dictionary of biochemistry and molecular biology. Oxford: Oxford Univ. Press, **1997.** 746 p.

Pabo C. O., Sauer R. T. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition // *Ann. Rev. Biochem.* **1992.** Vol. 61. P. 1053—1095.

Palmer M., Velicevic I., Saweljew P. et al. Streptolysin O: a proposed model of allosteric interaction between a pore forming protein and its target lipid bilayer // *Biochemistry.* **1998.** Vol. 37, N 8. P. 2378—2383.

Pauling L. A molecular theory of general anesthesia // *Science,* **1961,** Vol. 134, N 1. P. 15.

Pawelec G., Effros R. B., Caruso C. et al. T-cells and aging // *Frontiers in Biosci.* **1999.** Vol. 4. P. 216—269.

Pecheur E. I., Martin I., Ruyschaert J. M. et al. Membrane fusion induced by 11 mer anionic and cationic peptides. A structure — function study // *Biochemistry.* **1998.** Vol. 37, N 8. P. 2361—2371.

Pellegrini M., Mierke D. F. Structural characterization of peptide hormone/receptor interactions by NMR spectroscopy // *Biopolymers. (Peptide Sci.).* **1999.** Vol. 51, N 3. P. 208—220.

Pickart L. The biological effects and mechanism of action of the plasma tripeptide Glycyl-Histidyl-Lysin // *Lymphokines* / Ed. E. Pick. New York; London: Acad. Press, **1983.** Vol. 8. P. 425—446.

Pietrokovski S., Henikoff J. G., Henikoff S. The BLOKS database — a system for protein classification // *Nucl. Acid Res.* **1996.** Vol. 24. P. 197—200.

Protein targeting: A practical approach / Eds A. I. Magee and T. Willeman. Oxford: Oxford Univ. Press, **1993.** 315 p.

Re F., Zanetti A., Sironi M. et al. Inhibition of anchorage-dependent cell spreading triggers apoptosis in cultured human endothelial cells // *J. Cell Biol.* **1994.** Vol. 127, N 2. P. 537—546.

Reem G. H., Cook L. A., Henriksen D. M., Vilcek J. Gamma-interferon induction in human thymocytes activated by lectins and B-cell lines // *Infect. Immunol.* **1982.** Vol. 37, N 1. P. 216—221.

Regulatory peptides / Ed. J. M. Polak. Basel etc.: Birkhauser Verlag, **1989.** 396 p.

Reutter W., Kottgen E., Bauer C., Gerok W. Biological significance of sialic acids // *Sialic acids* / Ed. R. Schauer. Vien; New York: Springer-Verlag, **1982.** P. 263—304. (Cell Biol. Monographs; Vol. 10).

Richardson G. Hair-cell regeneration: keep the noise down // *Curr. Biol.* **1993.** Vol. 3. P. 759—762.

Rivier J., Kaiser R., Galyean R. Solid-phase synthesis of somatostatin and glucagon selective analogs in gram quantities // *Biopolymers (Reptide Sci.).* **1978.** Vol. 17, N 8. P. 1927—1938.

Robert L., Legeasis J. M., Robert A. M., Renard G. Corneal collagens // *Pathol. Biol. (Paris).* **2001.** Vol. 49, N 49. P. 353—363.

Rytomaa M., Kinnunen P. K. J. Dissociation of cytochrom C from liposomes by histone H1. Comparison with basic peptides // *Biochemistry.* **1996.** Vol. 35, N 14. P. 4529—4539.

Sahu A., Kalra S. P. Absence of increased neuropeptide Y neuronal activity before and during the luteinizing hormone (LH) surge may underlie the attenuated preovulatory LH surge in middle-age rats // *Endocrinology.* **1998.** Vol. 139, N 2. P. 696—702.

Schiffer M., Edmundson A. B. Use of helical wheels to represent the structures of proteins and to identify segments with helical potential // *Biophys. J.* **1967.** Vol. 7, N 2. P. 121—135.

Schlesinger D. H., Goldstein G., Niall H. D. The complete amino acid sequence of Ubiquitin, a adenilate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells // *Biochemistry.* **1975.** Vol. 14, N 10. P. 2214—2218.

Schmid S. L. Clatrin coated vesicle formation and protein sorting. An integrated process // *Annu. Rev. Biochem.* **1997.** Vol. 66. P. 511—548.

Shannon C. Prediction and entropy of printed English // *Bell System Techn. J.* **1951.** Vol. 30, N 1. P. 50—64.

Simon M. I. Summary: The cell surface regulates information flow, material transport, and cell identity // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **1992.** Vol. 57. P. 673—688.

Singer S. Y. The structure and function of membranes, a personal memoir // *J. Membran. Biol.* **1992.** Vol. 129, N 1. P. 3—12.

Stewart J., Stahmann M. Polyaminoacids, polypeptides and proteins / Ed. M. Stahmann. Madison: Visconsin Univ. Acad. Press, **1962.** P. 9—29.

Stone R. A., Glembofski C. C. Immunoreactive atrial natriuretic peptide in the rat eye // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* **1986.** Vol. 134. P. 1022—1028.

Strous G. J., Govers R. The ubiquitin-proteosome system and endocytosis // *J. Cell Sci.* **1999.** Vol. 112. P. 1417—423.

Suzuki T., Ichiyama A., Saitoh H. et al. A new 30 kDa ubiquitin-related SUMO-1 hydrolase from bovine brain // *J. Biol. Chem.* **1999**. Vol. 274, N 44. P. 31131—31134.

Takemura A., Matsuda N., Taneguchi S. Regeneration accelerators for periodontal tissue and materials / *Jpn. KoKai ToKKyo Koho JP* 06, 234,653 (C1 A61K37/02). **1994**.

Tanaka K., Nishide J., Okasaki K. et al. Characterisation of fission yeast SUMO-1 homologue, Pmt3p, required for multiple nuclear events, including the control of telomere length and chromosome segregation // *Nucl. Cell Biol.* **1999**. Vol. 19, N 12. P. 8660—8672.

Tanatani A., Fukutomi R., Ranuta H. et al. Novel DNA minor groove binders with an aromatic layered structure // *Nucl. Acid Symp. Ser.* **1998**. Vol. 39. P. 31—32.

Tang L., Li J., Kotz D. S., Feng J.-A. Determining the DNA bending angle induced by non-specific high mobility group-1 (HMG-1) proteins — a novel method // *Biochemistry.* **2000**. Vol. 39, N 11. P. 3052—3060.

Tang Y. A., Yuan J., Osapay G. et al. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leucocytes by the ligation of two truncated defensins // *Science.* **1999**. Vol. 286. P. 498—502.

Tappia P. S., Padua R. R., Panagia V., Kardami E. Fibroblast growth-factor-2 stimulates phospholipase C β in adult cardiomyocytes // *Biochem. Cell Biol.* **1999**. Vol. 77, N 6. P. 569—575.

Teitelbaum D., Meshorer A., Hirshfeld H. et al. Copolymers for treatment of encephalomyelitis // *Europ. J. Immunol.* **1971**. Vol. 1, N 1. P. 242—248

Teng C. S., Teng C. T., Alfrey V. G. Studies of nuclear acidic proteins // *J. Biol. Chem.* **1971**. Vol. 246, N 11. P. 3597—3609.

Tomas T., Thomas G., McLendon C. et al. β -Amyloid — mediated vasoactivity and vascular endothelial damage // *Nature.* **1996**. Vol. 380, N 6570. P. 168—171.

Tomoaia-Cotisel M. Acid dissociation constants diphytanylglycerol phosphorylglycerol methylphosphate // *Chem. and Phys. Lipids.* **1999**. Vol. 100, N 1—2. P. 41—54.

Unwin P. N. T., Ennis K. Two configurations of a channel-forming membrane protein // *Nature.* **1984**. Vol. 307. P. 609—612.

Van Holde K. E. *Chromatin.* New York; London: Springer-Verlag, **1988**. 497 p.

Wainer P. K., Langridge R., Blaney J. M., Kollman P. A. Electrostatic potential molecular surfaces // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **1982**. Vol. 79, N 12. P. 3754—3758.

Wakim B. T., Alexander K. A., Masure H. R. et al. Amino acid sequence of P-57, a neurospecific calmodulin-binding protein // *Biochemistry.* **1987**. Vol. 26, N 23. P. 7466—7470.

Weiss O., Jimenez-Montano M. A., Herzel H. Information content of protein sequences // *J. Theor. Biol.* **2000**. Vol. 206. P. 379—386.

W. H. O. Working group: Preventing disability in the elderly. Copenhagen: WHO Regional office for Europe, **1982**. EURO Reports and studies N 65.

Wilkinson K. D., Audhya T. K. Stimulation of ATP-dependent proteolysis requires Ubiquitin with the COO-terminal sequence Arg—Gly—Gly // *J. Biol. Chem.* **1981**. Vol. 256, N 17. P. 9235—9241.

Willeman T., Harding C., Stahl P. Receptor-mediated endocytosis // *Biochem. J.* **1985**. Vol. 232, N 1. P. 1—14.

Wolffe A. P. Architectural transcription factors // *Science*. **1994**. Vol. 264. P. 1100—1101.

Yamamoto N. Antihypertensive peptides derived from food proteins // *Biopolymers (Peptide Sci.)*. **1997**. Vol. 43, N 2. P. 129—138.

Yuasa K., Michibata H., Omori K., Yanaka N. A novel interaction of cGMP-dependent protein kinase I with troponin T // *J. Biol. Chem.* **1999**. Vol. 274, N 52. P. 37429—37434.

Yuqiu J., Juang C.-B., Keller D. et al. Mechanical, electrical, and chemical manipulation of single DNA molecules // *Nanotechnology*. **1992**. Vol. 3, N 1. P. 16—20.

Zhang S., Holmes T., Lockshin C., Rich A. Spontaneous assembly of a self-complementary oligopeptide to form a stable macroscopic membrane // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **1993**. Vol. 90, N 8. P. 3334—3338.

Zhou N. E., Kay C. M., Hodges R. S. Synthetic model proteins: the relative contribution of leucine residues at the nonequivalent positions of the 3—4 hydrophobic repeat to the stability of the two-stranded α -helical coiled-coil // *Biochemistry*. **1992**. Vol. 31, N 25. P. 5739—5746.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблицы I—V

Таблица I

Структуры регуляторных нейропептидов (по: Oxford Dictionary..., 1997; Ашмарин и др., 1999)

Наименование	Аминокислотная последовательность	Регуляторная функция
Тиролиберин	rENPa	Индуктор выделения тиротропина; циклическая форма глутамила и пролиламида на C-конце необходимы для проявления активности. Тиролиберин является и нейротрансмиттером, и нейромодулятором, увеличивает давление крови, повышает физическую активность, нарушает сон, подавляет половое и пищебывательное поведение; антидепрессант и антиопиоид
Гонадолиберин	ENWSYGLRPGa	Контролирует выделение гонадотропинов и люлиберина, активирует половое поведение
Пептид дельта-сна	WAGGDASGE	Противострессорный фактор, выделен из цереброспинальной жидкости; индуцирует дельта-сон
Брадикинин	RPPGFSPFR	Повышает проницаемость капилляров, понижает давление, местный индуктор боли, всегда сопутствует воспалению и аллергическому состоянию
Каллидин	KRPPGFSPFR	Гландулярная форма брадикинина
Нейрокинин A	NKTDSEFVGML	Встречается под названиями «нейромедин L» и «вещество K»; относится к семейству тахикининов, вызывает сжатие бронхов
Нейрокинин A (4—10)	DSFVbALMa	Селективный агонист рецепторов к нейрокинину A

Таблица I (продолжение)

Наименование	Аминокислотная последовательность	Регуляторная функция
Нейрокинин В	DMHDDFFVGLMa	Встречается под названием «нейромедин К»; возбуждает бронхи, вкусовые и обонятельные системы
Нейромедин В	GNLWATGHFM	Промотор роста, гомологичен бомбезину и нейромедину С; не все функции пока определены
Ангиотензин-I	DRVYIHPFHL	Слабо активен по сравнению со своими производными
Ангиотензин-II и III	DRVYIHPF и RVYIHPF	Повышают кровяное давление, стимулируют надпочечники, особенно синтез альдостерона
Нейротензин	pELYENKPRRPYIL	Найден в мозге и в кишечнике, особенно в N-клетках. Индуцирует гипотензию и сократительную мышечную реакцию, но регуляторный спектр гораздо шире
Соматостатин	AGCKNFFWKFTTSC	Ингибирует соматотропин и секреторную функцию поджелудочной железы, может действовать как нейротрансмиттер; эффекты в разных тканях различаются
Соматолиберин	YADAIFTNSYRKVLGQILSARKLLQDI MSRQQGESDQERGARLa	Индуцирует секрецию соматотропина
Вазопрессин	CYFQNCPRGa	Подавляет диурез, стимулирует повышение давления, активирует консолидацию памяти; один из факторов латерализации
Окситоцин	CYIQNCPLGa	Активатор тонуса матки, стимулятор лактации, умеренный антагонист вазопрессина
Вещество Р	RPKPQQFFGLMa	Нейротрансмиттер, стимулирует выделение ацетилхолина

Пептид YY	YPIKPEAPGEDASPEELNRYVYASLRHY LNLVTRQRYa	Относится к семейству панкреатических пептидов, ингибирует активность панкреаса, регулирует перистальтику и аппетит
Нейропептид Y	YPSKPDNPGEDAPAEEDMARYYSALRN YINLITRQRYa	Наиболее сконцентрирован в мозге, в адринальных железах и сердце; регулирует секрецию гонадотропина
Кортикотропин	YSMEHFRWVGKPVGKKRRRPVKVYPN GAEDESAEAFPLEF	Стимулирует рост надпочечников, синтез и выделение кортикостероидов; его фрагменты 4—7 и 4—10 стимулируют внимание и запоминание
α -Меланоцит-стимулирующий гормон	SYSMEHFRWVGKPVa	Активирует меланоциты, стимулирует кожную чувствительность, его фрагмент 1—13 активирует эмоциональное поведение, стимулирует внимание и запоминание
Кортиколиберин	SQEPILSLDLTEHLLREVLEMTKADQI AQQAHSNRKLLDILA	Индусирует выделение АКГГ, стимулирует двигательную активность с подавлением пищевого поведения и полового поведения
Кальцитонин	CGNLSTCMLGTYTQDFNKNKFTFPQ TAIGVGAPa	Выделяется С-клетками щитовидной железы, регулирует уровень кальция и фосфатов в крови и размещение этих компонентов в костях
A-Ко-кальцигенин	ACLTATCVTHRLAGLLSRSGGVVRNN FVPTNV	Мощный вазодилатор периферических и мозговых сосудов
Галанин	GWTLSAGYLLGPHAVGNHRSFSDKN GLTS	Широко распространен в центральных нейронах; вызывает контракцию гладкой мускулатуры гастро-интестинальных и урогенитальных трактов, ингибирует выделение инсулина и образование цАМФ в стимулированных клетках
	GWTLSAGYLLGPHA	Агонист рецепторов галанина в гиппокампе

Таблица I (продолжение)

Наименование	Аминокислотная последовательность	Регуляторная функция
Дегранулирующий пептид тучных клеток	IKCNCKRRHVIKPHICRKICGKNa	Стимулирует дегрануляцию тучных клеток с соответствующим освобождением 5-гидроокситриптамина и гистамина, а также блокирует Ca^{2+} -зависимые K^{+} -каналы нейронов
β -Эндорфин	YGGFMTSERSQTPLVTLFKNAIIK	Опиоиды; индуцируют анальгезию, изменение поведения, соматические эффекты, близкие к опиоидным
α -Эндорфин	NAYKKGE	
Мет-энкефалин	YGGFMTSERSQTPLVT YGGFM	Вызывает кратковременную анальгезию, индуцирует некоторые соматические эффекты, агонист опиоидных рецепторов
Лей-энкефалин	YGGFL	Вызывает анальгезию, агонист опиоидных рецепторов Частичный антагонист опиоидов
Мет-энкефалин-REL	YGGFMRELa	

Пептиды желудочно-кишечного тракта (по: Климов, 1983; Гомазков, 1995; Oxford Dictionary..., 1997)

Наименование	Аминокислотная последовательность	Функция
Гастрин	PELGPPQHVLVADPSKKQGPWLVEEEEEAYGWMDFa QGPWLVEEEEEAYGWMDFa WMDFa HSDGTFTSELSRLREGARLQRLQLQGLVa	Синтезируется в желудке, стимулирует выделение кислоты слизистой желудка; фрагменты имеют близкую активность
Малый гастрин		Ингибирует выделение кислоты в желудке, стимулирует выделение ферментов и электролитов в кишечнике
Тетрагастрин		Выделяется в тонком кишечнике в ответ на присутствие глюкозы; стимулирует выделение инсулина
Секретин		Синтезируется в двенадцатиперстной кишке, стимулирует опустошение желчного пузыря; фрагменты имеют близкую активность
Гастроингибирующий пептид	YAEGTFTSIDYSIAMDKINQQDFVNWLLAQKGKKNDWKHNITQ	Синтезируется в поджелудочной железе; по действию противоположен инсулину
Холецистокинин	KAPSGRMSIVKNLQNLDPHSRISDRDYMGWMDFFa ISDRDYMGWMDFFa DYMGWMDFFa WMDFa HSQGTFTSDYSKYLSRRRAQDFVQWLMNT	Содержится в нервных клетках кишечника; нейротрансмиттер, понижает давление, вазодилатор
Холецистокинин-12		Синтезируется в поджелудочной железе; по действию противоположен инсулину
Холецистокинин-8		Содержится в нервных клетках кишечника; нейротрансмиттер, понижает давление, вазодилатор
Тетрагастрин		Синтезируется в поджелудочной железе; по действию противоположен инсулину
Глюкагон	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYNLSILNa HADGVFTSDFSKLLGQLSAKKYLESLMa	Содержится в PP-клетках поджелудочной железы; регулирует ее функции и функций кишечного тракта
Вазоактивный кишечный пептид (VIP)	APLERVYPGDNATPEQMAQYAADLRRYINMLTRPRYa	Содержится в PP-клетках поджелудочной железы; регулирует ее функции и функций кишечного тракта
Пептид H1		
Пептид PP		

Таблица II (продолжение)

Наименование	Аминокислотная последовательность	Функция
Генно-родственный кальцитонин-пептид	SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKDNEFVPTNVGSEAFa	Присутствует в ЦНС, ганглиях и клетках желудочно-кишечного тракта; ингибирует перистальтику желудочно-кишечного тракта, стимулирует выделение катехоламинов и понижает кислотность желудка
Мотилин	FVPIFTHSELQKIREKERNKGQ	Увеличивает моторику желудка и кишечника, стимулирует выделение пепсина и секрецию панкреаса

Иммуностимулирующие пептиды (по: Immunostimulants, 1987; Oxford Dictionary..., 1997)

Наименование	Аминнокислотная последовательность	Функция
Бурсин	KHGa	Гормон селективной дифференцировки В-лимфоцитов Ингибирует иммунный ответ Контролирует развитие и активность лимфоцитов; для проявления активности необходимо присутствие ионов цинка Контролирует активность Т-лимфоцитов Контролирует созревание и функционирование В-лимфоцитов Участвует в дифференцировке Т-лимфоцитов в тимусе Индуктирует экспрессию антигенов дифференциации; необходим для развития и функционирования Т-клеток Активный фрагмент природного тимопестина Синтетический аналог тимопестина; контролирует развитие и функционирование Т-лимфоцитов Ингибирует репликацию вируса иммунодефицита человека Регулятор деления и дифференциации лимфоцитов, участвует в перестройках хроматина и в протеолизе цитоплазматических белков
Антивоспалительный пептид	EDR	
Тимический сывороточный фактор (тимулин)	pEAKSQGGSN	
Тимический гуморальный фактор	LEDGPKFL	
Тимозин α_1	AcSDAAVDTSSSEITTKDLKEKKEVVEEA	
Тимозин β_4	AcSDKPDMAEIEKPDKSKLKKTTETQEKNP LP SKETIEQEKQAGES	
Тимопоэтин	PEFLEDPSVLYKEKLKSELVANNVTLPAGEE RKDVVVELYLESLALKR	
Тимопоэтин-II	RKDV	
Тимопентин	RKDVY	
Ингибитор протеиназы ВИЧ-вируса	FLREDLAF	
Убиквитин	MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQD KEGIPPDQORLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQ KESTLHLVLRIRGG	

Атриопептиды-регуляторы (по: Алексеев и др., 1987; Gunning et al., 1992)

Наименование	Аминокислотная последовательность	Функция
Атриопептин I	SSCFGGRMMDRIGAQSGGLGCNS	Стимулирует выделение солей и жидкости через почки
Атриопептин II	SSCFGGRMMDRIGAQSGGLGCNSFR	Та же; а также вызывает спазм коронарной артерии
Атриопептин III	SSCFGGRMMDRIGAQSGGLGCNSFRY	Та же; а также спазмолитическая активность на кровеносных сосудах
Кардионатрин	SLRRSSCFGGRMMDRIGAQSGGLGCNSFRY	Та же; а также понижает артериальное давление
Уродилатин	TAPRSLRRSSCFGGRMMDRIGAQSGGLGCNSFRY	Та же; а также увеличивает поток плазмы в почках
Натриуритический пептид мозга	SPKMVQSGSGCFGRKMDRISSSSGLGCKVLRRH	Та же; а также стимулирует гуанилатциклазу в клетках мозга
Натриуретический пептид C-типа	GLSKGCGFLKLDRI GSM SGLGC	Та же; а также отличается от кардионатрина сродством к рецепторам

Аминокислотные последовательности регуляторных белков, использованные в расчетах информационного содержания полипептидной цепи

Наименование	Аминокислотная последовательность	Литературный источник
Нейротрофический фактор глиальных клеток	MKLWDVAVCLVLLHTASAF ²⁰ PLPAGKRLLAPAEHSLGH ⁴⁰ RRVPFALTSDSNMPEDYPDQ ⁶⁰ FDDVMDFIQATIKRLKRPD ⁸⁰ KQAAALPRERNRQAAAA ¹⁰⁰ ENSRGKGRRGQGRGNRGCVL ¹²⁰ TAIHLNVTDLGLGYETKEEL ¹⁴⁰ FRYCSGSCPAEATMYDKIL ¹⁶⁰ KNLSRSRRRLTSDKVGVQACCR ¹⁸⁰ PVAFDDDL ²⁰⁰ SFLDSSLVYHIL ²²⁰ RKHSKRCCGCI ²⁴⁰	Lin et al., 1993
Нейролептический белок Р-57	MLCCMRRTKQVEKNDQKI ²⁰ EQDGKIPEDKANKAATKIQA ⁴⁰ SFRGHITRKKLKGKKGGDAP ⁶⁰ AAEAEANEKDEAAVAEGTEK ⁸⁰ KEGEGSTPAEAPGAGPKPE ¹⁰⁰ EKTGKAGETPKKGEGAPDAA ¹²⁰ TEQAAPQAPAPSEEEKAGSAE ¹⁴⁰ TESATKASTDNPSSSKAEDA ¹⁶⁰ AKEEPKQADVPAAVTAAAA ¹⁸⁰ NAPAAEDAAAATAQPIPTET ²⁰⁰ AESSQAEEKI EAVDETCKPKD ²²⁰ SARQDEGKGGEEREADQEHNA ²³⁹	Wakim et al., 1987
Тропонин-Т	AcSDVEEAEEYEEQEEAAEE ²⁰ HEEAEEEEAGGEAEAGEPST ⁴⁰ AEDGEEEEEGREAE ⁶⁰ EGPVEEF ⁶⁰ KPKPRPFMPNLLPPKIPDGE ⁸⁰ RVDFFDIHRKRMKEDLNELQ ¹⁰⁰ TLIEAHFENRKKKEEELVSL ¹²⁰ KDRIEKRRAEAEQQRJAE ¹⁴⁰ REKERQTRLAEEARAREEEEE ¹⁶⁰ SRRKAEDAEARKKALSNNMMH ¹⁸⁰ FGYIQKAQTERKSGKRQTE ²⁰⁰ REKKKKILAEERKKVLAIDHL ²²⁰ NEDQLREKAKELWQNIYDLE ²⁴⁰ AEKFDLQEKFKQKYEINVL ²⁶⁰ RNRINDNQKVSCTRGA ²⁸⁰ KAKVT ³⁰⁰ GRWK ²⁸⁴	Leszyk et al., 1987
Тромбоцитарный фактор роста эпителиальных клеток	MAALMTPGTGAPPAPGDFSG ²⁰ EGSQGLPDSPPEPKQLPELI ⁴⁰ RMKRDGGRLSEADIRGFVAA ⁶⁰ VWNGSAQGAQIGAMLMALIRL ⁸⁰ RGMDLEETSVLTQALASQG ¹⁰⁰ QLEWPEAWRQQLVDKHSSTGG ¹²⁰ VGDKVSLVLAPALAACGCKV ¹⁴⁰ PMISGRGLGHTGGTLDKLES ¹⁶⁰ PGFNVIQSPQMQVLLDQA ¹⁸⁰ GCCINVGQSEQLVPADGILYA ²⁰⁰ ARDVTATVDSLPLITASILS ²²⁰ KKLVEGLSALVVDVKFGGAA ²⁴⁰ VFPNQEQAARELAKTLVGVA ²⁶⁰ SLGLRVAALATAMDKPLGRC ²⁸⁰ VGHALEVEEALCMGDGAGPP ³⁰⁰ DLRDLVTLLGGALLWSGHA ³²⁰ GTQAQGAARVAALDDGSAL ³⁴⁰ GRFERMLAAQGVDPGLARAL ³⁶⁰ CSGSPAERRQLLPRAREQEE ³⁸⁰ LLPADGTVELVRLPALV ⁴⁰⁰ LHELGAGRSRAGEPLRLGVG ⁴²⁰ AELLVDVGQRLRRGTPLWLRV ⁴⁴⁰ RDGRALSGPQSRALQEALV ⁴⁶⁰ LSDRAPFAAPLFAELVLPPQ ⁴⁸²	Heldim et al., 1991

Таблица V (продолжение)

Наименование	Аминокислотная последовательность	Литературные источники
Сосудистый фактор роста эндотелия	APMAEGGQKPHWVKFMDVY ²⁰ QRSFCRPIETLVDIFQEYPD ⁴⁰ EIEFIFKPSVPLMRCGGCC ⁶⁰ NDESLECVPTTEFNITMQIM ⁸⁰ RIKPHQSQHI GEMSFLOHNNK ¹⁰⁰ CECRPKKDKA RQENPCGPCS ¹²⁰ ERRKHLFVQDPQTCCKCKN ¹⁴⁰ TDSRCKARQLELNERTCRCD ¹⁶⁰ KPRRQ ¹⁶⁵	Heldin et al., 1991
Аквапорин 0 из хрусталика	MWELRSASFWRICAIEFFAS ²⁰ LFYVFFGLGASLRWAPGPIH ⁴⁰ VLQVALAFLGLALATLVQAVG ⁶⁰ HISGAHVNPAYTFAFLVGSO ⁸⁰ MSLLRAICYMVAQLLGAVAG ¹⁰⁰ AAVLYSVTTPPAVRGNLALNT ¹²⁰ LHFGVSVGQATIVEIFLTQ ¹⁴⁰ FVLCIFATYDERRNGRLGSV ¹⁶⁰ ALAVGFSLTGLHLEFGMYTGT ¹⁸⁰ AGMNPARSFAPAILTRNFTN ²⁰⁰ HWVYVWVGPVIGAGLGSLLYD ²²⁰ FLLFPRLKSVSERLSILKGS ²⁴⁰ RPSESNGQPEVTGEPVELKT ²⁶⁰ QAL ²⁶³	Nemeth-Cahalan, Hall, 2000

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	5
Введение	8
Глава 1. Пептиды в водных растворах	17
1.1. Особенности строения аминокислот и олигопептидов	17
1.2. Физико-химические особенности пептидов	30
1.2.1. Гидрофильно-гидрофобные свойства олигопептидов	30
1.2.2. Окислительно-восстановительные свойства простых пептидов	36
1.2.3. Конформации пептидов в растворе	42
1.3. Тканеспецифические регуляторные пептиды	59
1.3.1. Нейропептиды	63
1.3.2. Пептиды желудочно-кишечного тракта	68
1.3.3. Пептиды иммунной системы	70
1.3.4. Атриопептиды	72
1.4. Регуляторные пептиды как носители молекулярной информации	75
1.4.1. Частотные характеристики аминокислотных последовательностей РП	77
1.4.2. Информационная нагрузка аминокислотных последовательностей РП	83
1.4.3. Роль водородных связей в передаче молекулярных сигналов	98
Глава 2. Взаимодействие пептидов с клеточной мембраной	105
2.1. Строение фосфолипидного бислоя мембраны	107
2.2. Рецепторы плазматической мембраны	117
2.3. Взаимодействие регуляторных пептидов с рецепторами и фосфолипидами	126
Глава 3. Взаимодействие пептидов с хроматином клеточного ядра	136
3.1. Компонентный состав и строение хроматина	136
3.2. Межмолекулярные взаимодействия регуляторных пептидов и ДНК	142
3.3. Модельные и природные нуклеопротеиновые комплексы	152
Глава 4. Пептидная регуляция старения	159
4.1. Молекулярные механизмы старения	161
4.2. Теоретические и экспериментальные предпосылки коррекции возрастной патологии	171
Заключение	185
Литература	187
Приложение	211

CONTENTS

Foreword	5
Introduction	8
Chapter 1. Peptides in water solutions	17
1.1. Amino acid and oligopeptide features	17
1.2. Physical and chemical properties of peptides	30
1.2.1. Hydrophilic and hydrophobic properties of oligopeptides	30
1.2.2. Oxidative and reducing properties of peptides	36
1.2.3. Peptides conformations in solution	42
1.3. Tissue-specific regulatory peptides	59
1.3.1. Neuropeptides	63
1.3.2. Gastrointestinal peptides	68
1.3.3. Immunopeptides	70
1.3.4. Atrial natriuretic peptides	72
1.4. Regulatory peptides as carriers of molecular information	75
1.4.1. Relative frequencies of amino acid sequences of regulatory peptides	77
1.4.2. Information charge of amino acid sequences of regulatory peptides	83
1.4.3. Hydrogen bonds participation in molecular signal transmission	98
Chapter 2. Peptides—cell membrane interaction	105
2.1. Phospholipid bilayer structure in cell membrane	107
2.2. Receptors of cell membrane	117
2.3. Regulatory peptide interactions with receptors and phospholipids	126
Chapter 3. Peptides—chromatin interaction	136
3.1. Chromatin structure and composition	136
3.2. Intermolecular interactions of regulatory peptides and DNA	142
3.3. Native and model nucleoprotein complexes	152
Chapter 4. Peptide regulation of aging	159
4.1. Molecular mechanisms of aging	161
4.2. Theoretical and experimental prerequisites for treatment of age-related pathology	171
Summary	185
References	187
Appendix	211

Научное издание

Л. К. Шатаева, В. Х. Хавинсон,
И. Ю. Ряднова

**ПЕПТИДНАЯ САМОРЕГУЛЯЦИЯ
ЖИВЫХ СИСТЕМ
(ФАКТЫ И ГИПОТЕЗЫ)**

Утверждено к печати

*Президиумом Геронтологического общества
Российской академии наук
и Ученым советом Санкт-Петербургского института
биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН*

Редактор издательства *Л. С. Евстигнеева*
Художник *Л. А. Яценко*
Технический редактор *И. М. Кашеварава*

Лицензия ИД № 02980 от 06 октября 2000 г.
Подписано к печати 26.02.2003. Формат 60 × 90 ¹/₁₆. Бумага офсетная.
Гарнитура Таймс. Печать офсетная. Усл. печ. л. 14. Уч.-изд. л. 13.2.
Тираж 800 экз. Тип. зак. № 3913. С. 54

Санкт-Петербургская издательская фирма «Наука» РАН
199034, Санкт-Петербург, Менделеевская лин., 1
main@nauka.nw.ru

Санкт-Петербургская типография «Наука» РАН
199034, Санкт-Петербург, 9 лин., 12

ISBN 5-02-026192-0



9785020261921

Шатаева Лариса Константиновна

Ведущий научный сотрудник Отдела биологически активных полимеров Института высокомолекулярных соединений РАН, профессор, доктор химических наук, автор более 150 научных работ и изобретений.

Larissa K. Shataeva

Leading researcher of the Department of Biologically Active Polymers at the Institute of Macromolecular Compounds of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Professor, Doctor of Chemical Sciences, author of over 150 scientific works and inventions.

Хавинсон Владимир Хацкелевич

Директор Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН, вице-президент Геронтологического общества РАН, член-корреспондент РАМН, профессор, доктор медицинских наук, заслуженный изобретатель РФ, лауреат премии Совета Министров СССР, автор более 400 научных работ, изобретений и патентов.

Vladimir Kh. Khavinson

Director of the St. Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology of the North-Western Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Vice-President of the Gerontological Society of the Russian Academy of Sciences, Associate Member of the Russian Academy of Medical Sciences, Professor, Doctor of Medical Sciences, Distinguished Inventor of the Russian Federation, Winner of the USSR Council of Ministers Prize, author of over 400 scientific works, inventions and patents.

Рядинова Ирина Юрьевна

Старший научный сотрудник Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН, кандидат химических наук, автор 30 научных работ.

Irina Yu. Ryadnova

Senior Researcher of the St. Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology of the North-Western Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Ph. D. in Chemistry, author of 30 scientific works.
